Aus dem Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie
WE 18 FB 3 Freie Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Diether Neubert

Untersuchungen über den Einfluss von 2-Desoxy-D-Glucose und Natriumfluoracetat auf den Atmungsstoffwechsel von Rattenembryonen während der Organogenesephase in vivo und in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Meyer-Wendecker aus Bremen
und
Frauke Spielmann, geb. Wehmann aus Oldenburg i.O.

1977

Aus dem Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie
WE 18 FB 3 Freie Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Diether Neubert

Untersuchungen über den Einfluss von 2-Desoxy-D-Glucose und Natriumfluoracetat auf den Atmungsstoffwechsel von Rattenembryonen während der Organogenesephase in vivo und in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Meyer-Wendecker aus Bremen
und
Frauke Spielmann, geb. Wehmann aus Oldenburg i.O.

Referent: Professor Dr. med. Diether N e u b e r t

Korreferent: Professor Dr. Th. Günther

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 7. 7. 1977

W i d m u n g

Karin Apelt, Paul Lüth und Frank Winter gewidmet, weil sie ihre Fähigkeiten dort einsetzen, wo sie gebraucht werden.

Rainer Meyer-Wendecker

Herrn L. Dannemann gewidmet für das, was er mich lehrte.

Frauke Spielmann

Da die gegenwärtige Promotionsordnung fordert, daß aus einer solchen Gemeinschaftsarbeit Einzelleistungen ersichtlich sein müssen, haben wir die Arbeit wie folgt aufgeteilt:

Rainer M E Y E R - W E N D E C K E R bearbeitete den Abschnitt 2-Desoxyglucose (2-DG).

Frauke S P I E L M A N N bearbeitete den Abschnitt Natriumfluoracetat (NFA).

Ein Teil der Ergebnisse wurde schon 1973 mit Genehmigung des früheren Fachbereiches Klinisch-Theoretische Medizin (FB3) publiziert:

Spielmann, H., Meyer-Wendecker, R., Spielmann, F.:
"Influence of 2-desoxyglucose and sodiumfluoracetate on the respiratory metabolism of rat embryos during organogenesis."
Teratology 7, 127-134, 1973.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549616_0045

G L I E D E R U N G

I. Einleitung

1. Einführung S. 1
2. Energiestoffwechsel während der Organogenese S. 2
3. Atmungsmessung bei embryonalem Gewebe S. 3
4. Wirkung von Hemmstoffen des Energiestoffwechsels auf die embryonale Entwicklung S. 5
5. Eigene Problemstellung S. 6

II. Material und Methoden

1. Versuchstiere S. 8
2. Versuchsanordnung S. 9
3. Bestimmung des Q_{O_2} S. 10
4. Verwendete Pharmaka S. 12
5. Statistik S. 12
6. Teratologie S. 12

III. Ergebnisse

1. Normale Q_{O_2}- und Trockengewichte S. 13
2. Einfluß von 2 - DG und NFA in vitro auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen an Tag 11 und 12 und von Nierenschnitten erwachsener Ratten S. 16

2.1. Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} in vitro S. 16

2.2. Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} in vitro S. 21

3. Einfluß von 2 – DG und NFA in vivo auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht von Rattenembryonen am Tag 11 und 12 sowie auf den Q_{O_2} von Nierenschnitten erwachsener Ratten S. 26

3.1. Bestimmung der LD_{50} weiblicher Ratten nach Einzeldosen von 2 – DG und NFA S. 26

3.2. Einfluß von 2 – DG auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht in vivo S. 30

3.3. Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht in vivo S. 39

4. Teratologie nach Gaben von 2 – DG bzw. NFA während der Organogenese S. 49

4.1. Teratologie nach Gabe von 2 – DG S. 49

4.2. Teratologie nach Gabe von NFA S. 52

IV. Diskussion

1. Aussagekraft von Atmungsmessungen mit ganzen Embryonen S. 54

2. Wirkung von 2 – DG und NFA auf die Atmung in vitro S. 55

3. Embryonale Atmung nach Behandlung der Muttertiere mit 2 – DG und NFA S. 57

4. Teratologie S. 57

V. Zusammenfassung S. 60

VI. Literaturverzeichnis S. 62

VII. Lebensläufe S. 66

1. EINLEITUNG

1. Einführung.

Forschung auf dem Gebiet der embryonalen Säugetierentwicklung ist in den letzten Jahren zunehmend intensiviert worden, um zu einem besseren Verständnis der Wirkung embryotoxischer Substanzen zu gelangen. Insbesondere die Thalidomid - Katastrophe (Lenz '62') zeigte deutlich, daß die herkömmliche morphologisch - deskriptive Teratologie einer Ergänzung durch pharmakologisch - biochemische und elektronenoptische Untersuchungen bedarf. Zwar wurde bisher die embryonale Entwicklung von Amphibien und Vögeln schon sehr weitgehend erforscht, jedoch lassen sich diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Säugetierentwicklung übertragen. Im Gegensatz zu diesen beiden Gattungen ist der Säugetierembryo durch die Entwicklung in der Mutter und die Ernährung und Versorgung über die Plazenta gekennzeichnet. Bisher haben teratologische Untersuchungen gezeigt, daß der Säugetierembryo während der Phase der Organogenese gegenüber embryotoxischen Einflüssen am empfindlichsten ist. Aus diesen Gründen versucht man eingehend den normalen Stoffwechsel der Embryonen und auch den Einfluß von Pharmaka besonders in dieser Phase zu untersuchen (Neubert et al. '71a'). Die Phase der Organogenese vollzieht sich bei der Ratte während der Tage 9-13; sie ist gekennzeichnet durch die Ausbildung der Plazenta, die Anlage der Organe und ein besonders intensives Wachstum (Warburg et al. '24'; Köhler et al.'72'). Während dieser Entwicklungsphase ist gerade der Energiestoffwechsel wichtig, der das intensive Wachstum ermöglicht.

Dabei ist vor allem von Interesse, ob sich der Energiestoffwechsel des Embryo von dem erwachsener Gewebe unterscheidet.

2. Energiestoffwechsel während der Organogenese.

Schon 1925 beschrieb Negelein bei in vitro Versuchen mit Rattenembryonen eine Laktatbildung mit gleichzeitigem hohen Sauerstoffverbrauch während der Phase der Organogenese. Aber sowohl Negelein wie auch andere Autoren (Brock et al. '38') bezeichneten diese aerobe Glykolyse als ein experimentell bedingtes Artefakt. Besonders Warburg (Warburg '23') betonte, daß es eine aerobe Glykolyse nur bei Tumorgewebe gäbe. Neuere Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen (De Plaen '70'; Köhler und Peters '70'; Tanimura und Shepard '70a'; Neubert et al. '71b') machen jedoch eine "physiologische" Laktatbildung bei Rattenembryonen am Tag 11 der Schwangerschaft sehr wahrscheinlich. Außerdem wurde ein starker Abfall der Laktatbildung zwischen Tag 11 und 12 beschrieben. Dieser Befund wird als Anzeichen für eine starke Abhängigkeit der 11 Tage alten Embryonen von der Glykolyse interpretiert, die von Tag 12 ab stark abnimmt. Unterstützt werden die Ergebnisse durch Untersuchungen von Cox und Gunberg ('72a') an embryonalen Rattenherzen. Diese Autoren konnten zeigen, daß nur Substanzen aus dem Embden-Meyerhoff-Weg (Glykolyse) in der Lage sind, die Funktion von 11 Tage alten Embryonenherzen, gemessen als Schlagfrequenz, in vitro aufrecht zu erhalten, und zwar sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Dagegen wurde die Funktion embryonaler Rattenherzen an Tag 12 nur unter aeroben Bedingungen durch eine Reihe von Substanzen

aus dem Citrat-Zyklus aufrechterhalten, Substanzen aus der Glykolyse waren signifikant weniger wirksam. Andere Autoren haben sich in der letzten Zeit intensiv mit dem Problem der oxidativen Phosphorylierung während der Organogenese befaßt. Aksu et al. ('68') berichteten bei Untersuchungen an Homogenaten und Bass ('70') sowie Mackler et al. ('73') mit Mitochondrienfraktionen von Rattenembryonen über eine Zunahme der Aktivität der oxidativen Phosphorylierung zwischen den Tagen 10 1/2 und 14. Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß im Energiestoffwechsel von Rattenembryonen zwischen den Tagen 11 und 12 ein Wechsel vom Vorherrschen der Glykolyse zu einem Überwiegen der oxidativen Phosphorylierung stattfindet.

3. Atmungsmessung bei embryonalem Gewebe.

Bei Untersuchungen des Energiestoffwechsels von Rattenembryonen während der Organogenese führte Negelein 1925 manometrisch mit der Warburg - Methode nicht nur Messungen der Glykolyse - Rate sondern auch der Atmung durch. Er fand dabei einen relativ hohen O_2 - Verbrauch bei embryonalem Gewebe. Später untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen (Kleiber et al. '43'; de Plaen '70') intensiv die Atmung ganzer Rattenembryonen mit der direkten Warburg - Methode. Sie berücksichtigten dabei jedoch nicht die von Warburg ('23') angegebenen Voraussetzungen für seine Methode. Bei der Atmungsmessung mit der direkten Methode von Warburg wird als Meßgröße der Atmung der Sauerstoffverbrauch (Q_{O_2}) bestimmt. Er ist definiert als (Warburg '23'):

$$Q_{O_2} = \frac{\text{verbrauchter } O_2 \ (mm^3)}{\text{mg Gewebe (Trockengewicht)} \cdot \text{Stunden}}$$

Bei der Bestimmung der Atmung mit der Warburg - Methode dürfen die Gewebeproben wegen der Länge des Diffusionsweges im zu bestimmenden Gewebe die "Grenzschnittdicke" (d) (Warburg '23') nicht überschreiten. Sie ist definiert:

$$d = \sqrt{8 \cdot C_o \frac{D}{A}}$$

Dabei ist C_o = die O_2- Konzentration
D = die Diffusionskonstante
A = der O_2- Verbrauch pro Volumen u. Zeiteinheit

Wird bei Atmungsmessungen Luft als Gasphase verwendet, so darf die "Grenzschnittdicke" 0,2 mm nicht überschreiten, bei einer reinen Sauerstoffatmosphäre darf sie 0,4 mm nicht überschreiten. Spielmann und Lücke ('71', '73') fanden, daß bei Messungen in reiner O_2 - Atmosphäre die"Grenzschnittdicke" an den Tagen 11 und 12 bei Ratten- und an den Tagen 9 und 10 bei Mäuseembryonen nicht überschritten wird. Die von Netzloff und Mitarbeitern ('68a') sowie von de Plaen ('70') beschriebene Abnahme der Atmung (Q_{O_2}) ganzer Ratten- bzw. Mäuseembryonen an den darauffolgenden Tagen ist auf ein Überschreiten der "Grenzschnittdicke" zurückzuführen (Spielmann und Lücke '71', '73'). So führte z.B. die Nichtbeachtung der "Grenzschnittdicke" bei einer Retardierung von 13 bzw. 14 Tage alten Rattenembryonen durch eine Vorbehandlung der Muttertiere mit einer Folsäurefreien Diät zu einer scheinbaren Erhöhung des Q_{O_2} (Netzloff et al. '68b').

4. Wirkung von Hemmstoffen des Energiestoffwechsels auf die embryonale Entwicklung.

Die Differenzierungs - und Wachstumsvorgänge sind während der Phase der Organogenese auf einen geregelten Ablauf des Energiestoffwechsels angewiesen. Daher wurden in der experimentellen Teratologie verschiedentlich Hemmstoffe des Energiestoffwechsels angewandt, um Störungen der normalen embryonalen Entwicklung zu erzeugen. So konnte z.B. eine Forschergruppe (Shepard et al. '68'; Akzu et al. '68') mit einer Riboflavin - Mangeldiät, die mit Galaktoflavin angereichert war, bei schwangeren Ratten bis zu 95% mißgebildete Embryonen erzeugen und gleichzeitig nachweisen, daß die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung als Folge der Behandlung gegenüber Kontrollembryonen an den Tagen 12 bis 16 der Schwangerschaft signifikant erniedrigt war.

Außerdem führte ein durch 9-Methylpteroylglutaminsäure hervorgerufener Folsäuremangel während der Schwangerschaft bei Ratten zu vielfach mißgebildeten Embryonen (Johnson et al. '63'). Genauere Untersuchungen des Energiestoffwechsels der so behandelten Rattenembryonen zeigten eine Störung der Atmung (Netzloff et al. '68b','72'). Diese ist wahrscheinlich auf eine mangelnde Funktion der Mitochondrien auf Grund einer Synthesestörung der mitochondralen Membranen zurückzuführen (Chepenik und Waite '75').

De Meyer und de Plaen ('64') beschrieben in einer anderen Versuchsserie verschiedenartige Mißbildungen und eine vermehrte Resorptionsrate nach Behandlung schwangerer Ratten während der Organogenese mit 2-Desoxy-Glucose (2 - DG), einem spezifischen Hemmstoff der Glykolyse, bzw. mit Natriumfluoracetat (NFA), einem

spezifischen Hemmstoff des Zitronensäure - Zyklus.

Dieselben Autoren stellten einen verminderten Einbau von C^{14} - Glukose und C^{14} - Acetat in ganze Embryonen in Gegenwart der beiden Hemmstoffe 2 - DG und NFA fest. Auch Tanimura und Shepard ('70b') fanden in Gegenwart von 2 - DG eine Wachstumshemmung bei in-vitro kultivierten 11 Tage alten Rattenembryonen und gleichzeitig einen verminderten C^{14} - Glukose Einbau in die Protein - und Nucleinsäurefraktion der Embryonen.

5. Eigene Problemstellung.

Nach allen bisher vorliegenden Untersuchungen scheint im Energiestoffwechsel von Rattenembryonen an den Tagen 11 und 12 ein Wechsel von der Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung hin stattzufinden. Als Paramster des Energiestoffwechsels läßt sich an diesen beiden Tagen die Atmung in einer reinen O_2 - Atmosphäre mit der direkten Warburg - Methode bestimmen. Zu einer genaueren Abklärung der Veränderung des Energiestoffwechsels zwischen den Tagen 11 und 12 bot es sich daher an, den Effekt von einem Hemmstoff der Glykolyse und einem Hemmstoff des Zitronensäure - Zyklus auf die Atmung der Embryonen zu untersuchen. Als spezifischen Hemmstoff der Glykolyse verwendeten wir 2- DG. Die Wirkung von 2 - DG ist darauf zurückzuführen, daß diese Substanz nach Phosphorylierung zu 2 - Desoxy-glucose - 6 - Phosphat kompetetiv das Enzym Phosphoglucose - Isomerase hemmt (Wick et al. '57'). Als spezifischen Hemmstoff des Zitronensäure - Zyklus benutzten wir NFA, welches spezifisch das Enzym Aconitase hemmt (Elliott und Kalnitzky '50').

Wir führten unsere Messungen des Q_{O_2} an Rattenembryonen an den Tagen 11 und 12 in vitro in Gegenwart der genannten Hemmstoffe durch und außerdem nach Vorbehandlung der Mütter mit 2 - DG und NFA. Weiterhin untersuchten wir, ob eine Behandlung schwangerer Ratten während der Organogenese mit diesen spezifischen Hemmstoffen des Energiestoffwechsels zu einer vermehrten Resorptionsrate bzw. Mißbildungen der Embryonen führt.

II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Versuchstiere

1.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Für die Experimente wurden weibliche ca. 200g schwere Albino - Ratten vom Stamme WISTAR SW 69 (Züchter: Winkelmann, Kirchborchen) verwendet. Die Tiere wurden unter einem festen Hell - Dunkel Rhythmus gehalten. Die Tagesperiode dauerte von 12h mittags bis 2h morgens, die Nachtperiode von 2h bis 12h. Dabei wurden konstante Bedingungen eingehalten:

Raumtemperatur 25°C
Relative Luftfeuchtigkeit 60%
Fütterung mit Altromin R
Tränkung mit Aqua ad libitum

Zur Paarung wurden jeweils ein Männchen mit drei Weibchen vier Stunden vor Beendigung der Dunkelperiode für zwei Stunden zusammengesetzt. Durch Vaginalabstriche wurde festgestellt, ob eine Paarung stattgefunden hatte. Die folgenden 24h wurden Tag 0 der Schwangerschaft genannt. Alle Versuche mit Rattenembryonen wurden um ca. 16 - 18h durchgeführt, um die Ergebnisse besser untereinander vergleichen zu können.

1.2 Präparation der Rattenembryonen

Die schwangeren Ratten wurden dekapitiert, die Bauchhöhle mit zwei Lateralschnitten eröffnet und die Uteri in toto herauspräpariert und in eine Petri - Schale mit Krebs - Ringer - Lösung gelegt. Dann wurde die Uteruswand vor-

sichtig incidiert, die Embryonen herausgenommen und von Blut und sämtlichen Eihäuten befreit.

1.3 Anfertigung von Nierenschnitten erwachsener Tiere.

Nach Exstirpation der Nieren, wurden diese von ihrer Kapsel befreit und in eine Petri - Schale mit Krebs - Ringer - Lösung gelegt. Die Gewebsschnitte wurden dann aus freier Hand mit einem Rasiermesser hergestellt. Zur Flächenbestimmung wurden die Gewebsschnitte rechteckig geschnitten und in eine zweite Petri - Schale mit Krebs - Ringer - Lösung und einer Millimeterpapierunterlage plaziert. So konnte die Fläche der Nierenschnitte bestimmt werden.

2. Versuchsanordnung.

In allen Experimenten wurde der Warburg - Apparat F 166 (Braun Melsungen) mit konischen 5 ml Warburg - Gefäßen benutzt. Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches wandten wir die direkte Methode nach Warburg an (Warburg '23'). Die Schüttelfrequenz des Warburg - Apparates betrug 110/min und das Wasserbad hatte eine Temperatur von 37°C. Die zentralen Zylinder der Warburg - Gefäße enthielten einen gefalteten Streifen Filterpapier, der mit 0,1 ml 20% NaOH getränkt war. Als Inkubationsmedium wurde 1 ml Krebs - Ringer - Phosphat - Lösung von pH 7,4 verwendet, die 0,1% Glucose enthielt. Die Embryonen und Nierenschnitte wurden mit Hilfe eines Spatels in die Warburg - Gefäße gebracht. Um eine Veränderung des atmosphärischen Druckes bzw. der Temperatur des Wasserbades zu erfassen, wurden in der Regel 3 der 15 Gefäße als Thermomanometer benutzt. Nach einer Vorinkubationszeit von 10 min wurden Manometer und Gefäße 3 min lang mit reinem O_2 durchströmt. Jeder Versuch lief über

60 min, dabei wurde der Manometerstand alle 10 min abgelesen. Nach Versuchsende wurden zuerst die Papierstreifen aus dem zentralen Zylinder mit einer Pinzette entfernt und dann das Inkubationsmedium mit den Gewebsproben in eine Petri - Schale mit Aqua dest. geschüttet. Die Embryonen und die Nierenschnitte wurden dann zweimal in Aqua dest. gewaschen und auf getrocknete abgewogene Alufolieplättchen zur Trocknung mit Heißluft gelegt.

Die Warburg - Gefäße wurden nach jedem Versuch gründlich mit Aceton entfettet, in Chromschwefelsäure gelegt und am nächsten Tag mit Aqua bidest. gewaschen. Nach Trocknung der Gefäße mit Heißluft wurden die Schliffe mit Silikon eingefettet.

3. Bestimmung des Q_{O_2}

3.1 Bestimmung des O_2 - Verbrauches

Zur Bestimmung des O_2 - Verbrauches wurden die an den Manometern abgelesenen Werte nach Berücksichtigung der Thermomanometer und anschließender Korrektur mit den jeweiligen Gefäßkonstanten multipliziert. Der so errechnete Wert ergab den O_2 - Verbrauch in µl. In die Berechnung der jeweiligen Gefäßkonstante ging das Gasvolumen der Manometer und der dazugehörigen Warburg - Gefäße ein, und zwar nach Subtraktion der Flüssigkeitsvolumina in den Gefäßen. Außerdem wurden Inkubationstemperatur und Art des Gases bei der Berechnung berücksichtigt. Entsprechend den Angaben von Spielmann und Lücke ('71') wurden bei Versuchen mit Embryonen Tag 11 vier Embryonen pro Gefäß, bei Versuchen mit Embryonen Tag 12 zwei Embryonen pro Gefäß verwendet. Nur Versuche, bei denen der O_2 - Verbrauch über eine Stunde konstant blieb, wurden zur Auswertung herangezogen.

3.2. Trockengewichts - Bestimmung

Um das Trockengewicht der Embryonen und der Nierenschnitte zu ermitteln, wurden die Gewebeproben vom Inkubationsmedium in Aqua dest. freigewaschen und dann auf getrocknete und gewogene Plättchen aus Alufolie gelegt. Danach wurden die Plättchen mit den Geweben aus den Warburg - Gefäßen 12h lang bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurden die Plättchen auf analytischen Mikrowaagen bis auf 0,01 mg genau gewogen. Nach Subtraktion des Plättchengewichtes ergab sich das Trockengewicht des Gewebes.

3.2.1. Berechnung der Schichtdicke von Nierenschnitten

Die Schichtdicke der Nierenschnitte wurde mit Hilfe des Trockengewichtes nach folgenden Kalkulationen von Warburg (Warburg '23') berechnet: " Das Trockengewicht, multipliziert mit 5, ergab mit hinreichender Genauigkeit das Frischgewicht und das Volumen. Mit der Fläche und dem Volumen der Schnitte war ihre Dicke gegeben, nämlich als das Verhältnis Volumen/Fläche ". Genauer ausgedrückt ist dies die " mittlere Dicke ", da die Schnitte in ihrer gesamten Ausdehnung nicht ganz gleichmäßig dick sind. Nur Nierenschnitte, die nach dieser Berechnung, bei unseren Versuchen in einer reinen O_2 - Atmosphäre, eine Schichtdicke von 0,37 mm nicht überschritten, wurden für die Versuchsanordnung verwendet.

3.3. Berechnung des Q_{O_2}

Der Q_{O_2} wurde nach Warburg ('23') in Abschnitt I, 3 definiert. Entsprechend der dort angegebenen Gleichung errechneten wir den Q_{O_2} aus den gemessenen Sauerstoffverbrauchs - und Trockengewichtswerten.

4. Verwendete Pharmaka

Alle Substanzen, die zur Herstellung der Inkubationsmedien nötig waren, wurden von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, bezogen. Die Hemmstoffe Natriumfluoracetat und 2 - Desoxyglucose erhielten wir von Calibochem, Los Angeles/Cal.USA.

5. Statistik

Die bei den verschiedenen Messungen erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des t - Testes nach Student miteinander verglichen, und zwar entsprechend der " Mathematik für Mediziner und Biologen " von G.Fuchs ('69'). Bei unserer Auswertung wurden daher beim Vergleich von zwei Gruppen von Meßwerten folgende Kriterien angewendet:

$p \leqslant 0{,}001 \quad (\hat{=} \leqslant 0{,}1\%)$ = signifikant

$p = 0{,}01 - 0{,}001$ = schwach signifikant

6. Teratologie

Einmalige intraperitoneale Gaben von NFA bzw. einmalige Dosen subcutan von 2 - DG wurden schwangeren Ratten an den Tagen 8,9,10 oder 11 appliziert. Am Tag 20 der Gravidität wurden die Muttertiere getötet und die Uteri auf Implantationsstellen und Feten untersucht. Die Feten wurden äußerlich inspiziert und gewogen. Anschließend wurden die Skelette mit Alizarin - Rot gefärbt und nach der von Lorke (Lorke '63', '65') angegebenen Methodik eingehend auf Mißbildungen untersucht.

III. E R G E B N I S S E

1. Normale Q_{O_2} -und Trockengewichtswerte

In Tab.1 und Abb.1 sind die normalen Q_{O_2} - und Trockengewichtswerte von Rattenembryonen an den Tagen 11,12,13 und 14 aufgeführt. Außerdem ist der Q_{O_2} - Wert von Nierengewebe erwachsener Ratten angegeben. Dabei handelt es sich ebenso wie in den Experimenten mit 2 - DG und NFA um Nierengewebe schwangerer Ratten. Aus Tab.1 und Abb.1 ist ersichtlich, daß der Q_{O_2} - Wert bei Rattenembryonen an den Tagen 13 und 14 signifikant niedriger ist als an den Tagen 11 und 12 ($p<0,001$). Diese " Abnahme " des Q_{O_2} - Wertes läßt sich nach Spielmann und Lücke ('71','73') mit einem Überschreiten der Grenzschichtdicke ganzer Rattenembryonen zwischen den Tagen 12 und 13 erklären. Aus diesem Grunde führten wir Messungen des Q_{O_2} - Wertes mit ganzen Rattenembryonen nur an den Tagen 11 und 12 durch. Die in Tab.1 aufgeführten Q_{O_2} - Werte für diese beiden Tage und auch die Angaben füe Nierengewebe erwachsener Ratten werden in den folgenden Experimenten als Normal - bzw. Kontrollwerte verwendet (100%).

Aus den Trockengewichtswerten der Rattenembryonen in Tab.1 und Abb.1 ist ein exponentieller Verlauf der Wachstumskurve der Embryonen während der frühen Organogenese deutlich zu erkennen. Die in Tab.1 aufgeführten Trockengewichtswerte der Embryonen an den Tagen 11 und 12 werden bei den in-vitro-Versuchen als Kontrollwerte (100%) der Normalentwicklung verwendet.

TABELLE 1 :

Normalwerte von Q_{O_2} und Trockengewicht

Anzahl der Bestimmungen in Klammern

+ Werte nach Spielmann und Lücke ('73')

Gewebe	Q_{O_2} (Zahl)	Trockengewicht (mg) (Zahl)
Niere (Mutter)	20,7 ± 1,7 (23)	
Embryo Tag 11	11,7 ± 1,2 (41)	0,34 ± 0,08 (41)
Embryo Tag 12	12,0 ± 1,0 (35)	1,49 ± 0,31 (35)
+ Embryo Tag 13	9,5 ± 1,0 (18)	4,60 ± 0,52 (18)
+ Embryo Tag 14	7,5 ± 1,2 (17)	9,50 ± 0,61 (17)

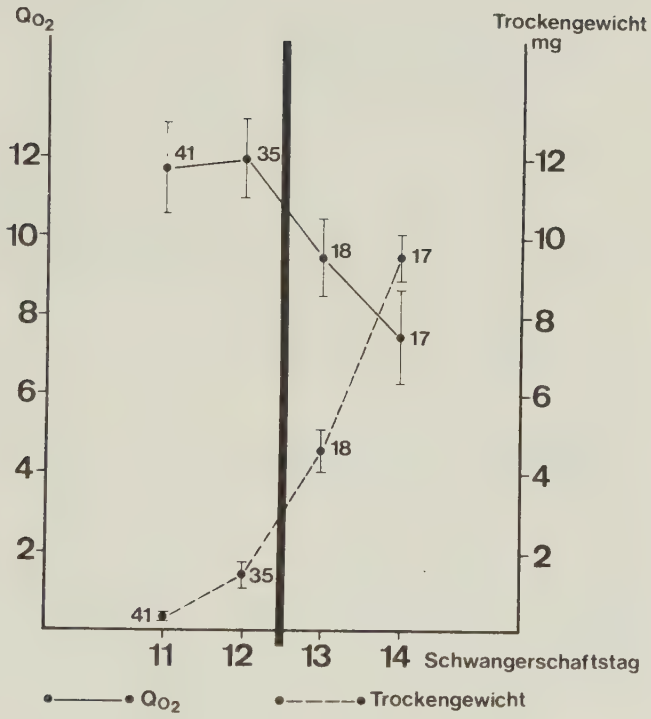

Abbildung I:

Normalwerte von Q_{O_2} und Trockengewicht von ganzen Rattenembryonen während der Organogenese:

Die Zahlen neben den Meßwerten geben die Anzahl der Messungen an.
Die Meßwerte ± Standardabweichung in Abbildung I entsprechen Tabelle I.
Zwischen Tag 12 und 13 wird die Grenzschichtdicke überschritten; das ist durch den senkrechten Strich angedeutet. Siehe auch I.3 und III.1.

2. Einfluß von 2 - DG und NFA in vitro auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen an Tag 11 und 12 und von Nierenschnitten erwachsener Ratten.

2.1. Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} in vitro.

2.1.1 Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen am Tag 11.

In der Tab.2 ist der Einfluß steigender Konzentrationen von 2 - DG in dem Bereich von 0,05 - 50 mM auf die Atmung von Rattenembryonen am Tag 11 aufgeführt. Wie aus Tab.2 ersichtlich ist, tritt eine Hemmung der Atmung erst bei Konzentrationen ab 0,5 mM 2 - DG ein. Eine genaue Analyse der Dosis - Wirkung - Beziehung zwischen 2 - DG - Konzentration und der Hemmung der Atmung der 11 - Tage Embryonen ist erst bei der graphischen Darstellung in Abb.2 möglich. Für Embryonen am Tag 11 zeigt Abb.2 bei halblogarithmischer Darstellung einen deutlich linearen Verlauf der Atmungshemmung für steigende Konzentrationen von 2 - DG im Bereich von 0,5 - 50 mM.

TABELLE 2 :

2 - Desoxyglucose am Tag 11 in vitro.

P = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Dosis	Q_{O_2} (Zahl)	%	P
Normalwert	11,7 ± 1,2 (41)	100 ± 10,3	
0,05 mM	11,5 ± 1,1 (6)	100 ± 8	≫
0,5 mM	10,53 ± 1,56 (16)	90 ± 13,5	< 0,01
5,0 mM	7,62 ± 1,64 (30)	65 ± 14	< 0,001
50,0 mM	4,63 ± 1,55 (16)	40 ± 13,2	< 0,001

7.1.2 Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen am Tag 12

Tab.3 zeigt den Einfluß steigenden Konzentrationen von 2 - DG in den Bereichen von 0,05 - 50 mM auf die Atmungsaktivität von Rattenembryonen am Tag 12. Diese ist im Gegensatz zu Rattenembryonen am Tag 11 jedoch erst ab Konzentrationen von 5,0 mM 2 - DG signifikant erniedrigt. Aus Abb.2 geht außerdem hervor, daß zwischen Konzentrationen von 5,0 - 50 mM 2 - DG die Kurve der Atmungshemmung bei halblogarithmischer Darstellung linear verläuft.

TABELLE 3 :

2 - Desoxyglucose am Tag 12 in vitro

p = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Dosis	Q_{O_2}	(Zahl)	%	p
Normalwert	12,0 ± 1,0	(35)	100 ± 8,3	
0,05 mM	12,7 ± 0,7	(3)	106 ± 5,8	»
0,5 mM	11,3 ± 1,0	(9)	94 ± 8,3	»
5,0 mM	9,6 ± 1,37	(18)	80 ± 11,4	< 0,001
50,0 mM	6,49 ± 0,79	(15)	54,1 ± 6,6	< 0,001

2.1.3 Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} von Nierenschnitten der Muttertiere.

In Tab.4 wird die Wirkung steigender Konzentration von 2 - DG auf den Q_{O_2} von Nierengewebe erwachsener Ratten aufgeführt. Wie bei Embryonen von Tag 12 tritt erst bei der Konzentration von 5,0 mM 2 - DG eine signifikante Erniedrigung des Q_{O_2} von Nierengewebe auf. Ebenso verläuft die Dosis-Wirkung - Beziehung zwischen 2 - DG und Atmungshemmung von Nierenschnitten bei Konzentrationen von 0,5 - 50 mM 2 - DG nach Abb.2 bei halblogarithmischer Darstellung linear.

TABELLE 4 :

2 - Desoxyglucose bei Nierengewebe in vitro.

P = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Dosis	Q_{O_2} (Zahl)	%	P
Normalwert	20,7 ± 1,7 (23)	100	
0,05 mM	20,8 ± 2,37 (5)	100 ± 11,4	≫
0,5 mM	19,81 ± 1,93 (8)	95 ± 9,3	≫
5,0 mM	15,73 ± 1,3 (13)	75,8 ± 6,3	< 0,001
50,0 mM	10,8 ± 1,8 (12)	52,1 ± 8,7	< 0,001

2.1.4 Vergleich der Wirkung von 2 - DG auf Embryonen Tag 11 und 12 sowie auf Nierengewebe.

In Tab.5 wird die Hemmwirkung gleicher 2 - DG Konzentrationen auf Embryonen an Tag 11 und 12 und auf Nierengewebe untereinander verglichen. Dabei wird deutlich, daß die prozentuale Hemmung bei Embryonen am Tag 12 und bei erwachsenen Nierengewebe identisch ist. Entsprechend verlaufen die Dosis - Wirkung - Kurven dieser beiden Gewebe in Abb.2 gleich. Im Gegensatz dazu zeigt Tab.5 und Abb.2 eine signifikant stärkere Hemmung der Atmung von Embryonen am Tag 11 im Vergleich zu Embryonen am Tag 12 und erwachsener Nierengewebe, und zwar im Konzentrationsbereich von 0,5 - 50 mM 2 - DG.

Bei in-vitro Versuchen ist also die prozentuale Hemmung der Atmung durch 2 - DG bei Rattenembryonen am Tag 11 signifikant stärker als diejenige von erwachsenem Nierengewebe. Dagegen verhalten sich 12 - Tage Embryonen wie erwachsenes Nierengewebe.

TABELLE 5 :

Berechnung der Signifikanz der Differenzen der 2 - DG Wirkung in vitro.

Konzentration von 2 - DG	Tag 11 und Tag 12	Niere und Tag 11	Niere und Tag 12
0,5 mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p \gg$
5 mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p \gg$
50 mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p \gg$

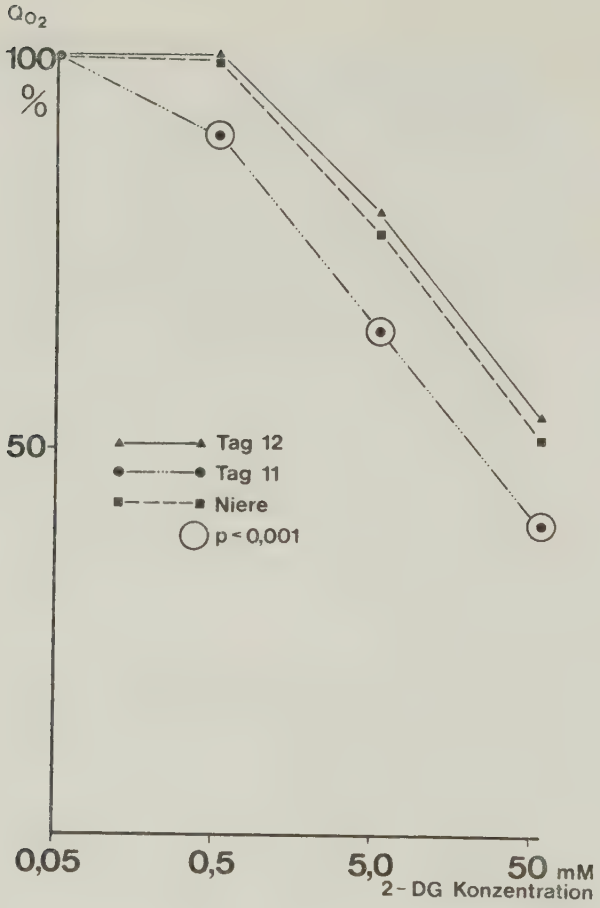

Abbildung 2:

Wirkung von 2-Desoxyglucose in-vitro auf den Q_{O_2} von ganzen Embryonen und Nierenschnitten:

Die Originalmeßwerte ± Standardabweichung sind in Tabelle 2-4 aufgeführt. 100% Q_{O_2} bezieht sich auf die Normalwerte für Tag 11, 12 und Niere in Tabelle 1. Die verwendeten 2-DG Konzentrationen sind logarithmisch aufgetragen. Die Kreise um einige Meßwerte deuten an, daß diese Werte signifikant unterschiedlich zu den übrigen Meßwerten [illegible] sind, siehe auch Tabelle 5.

2.2 Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} in vitro.

2.2.1 Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} von Embryonen am Tag 11.

In Tab.6 ist die Wirkung steigender Konzentrationen von NFA auf die Atmung von 11 - Tage Embryonen dargestellt. Bei einer Konzentration bis 0,1 mM NFA wurde die Atmung nicht beeinflußt, während der Q_{O_2} bei Konzentrationen ab 1,0 mM NFA gegenüber den unbehandelten Kontrollen signifikant erniedrigt ist. Der genaue Verlauf der Dosis - Wirkungs - Beziehung zwischen NFA und der Atmung von 11 - Tage Embryonen bei Konzentrationen von 1,0 - 100 mM läßt sich aus Tab.6 nicht erkennen und ist deshalb in Abb.3 graphisch dargestellt. Aus dieser Abb. ist für 11 - Tage Embryonen zwischen 0,1 - 100 mM NFA ein deutlich S - förmiger Verlauf der Hemmkurve der Atmung ersichtlich. Besonders interessant ist dabei, daß die Hemmung zwischen 10 - 100 mM NFA konstant bleibt.

TABELLE 6 :

Natriumfluoracetat am Tag 11 in vitro.

P = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Dosis	Q_{O_2} (Zahl)	%	P
Normalwert	11,7 ± 1,2 (41)	100 ± 10,3	
0,01 mM	11,4 ± 0,8 (6)	100	≫
0,1 mM	11,07 ± 1,76 (5)	95 ± 15	≫
1,0 mM	6,52 ± 2,0 (10)	56 ± 17	< 0,001
10,0 mM	5,27 ± 0,86 (15)	45 ± 7,4	< 0,05
100,0 mM	4,89 ± 1,19 (12)	41,8 ± 10,2	≫

2.2.2 Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} von Embryonen am Tag 12.

Tab.7 zeigt die Wirkung steigender NFA Konzentrationen auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen am Tag 12. Während Konzentrationen bis 0,1 mM NFA den Q_{O_2} nicht beeinflussen, zeigt sich bei Konzentrationen ab 1 mM NFA eine signifikante Hemmung der Atmung von 12 - Tage Embryonen. In Abb.3 zeigt sich ähnlich wie bei 11 - Tage Embryonen ein S - förmiger Verlauf der Hemmkurve. Auch bei 12 - Tage Embryonen nimmt die Hemmung der Atmung zwischen den Konzentrationen 10 - 100 mM NFA nicht signifikant zu.

TABELLE 7 :

Natriumfluoracetat am Tag 12 in vitro.

P = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Dosis	Q_{O_2}	(Zahl)	%	p
Normalwert	12,0 ± 1,0	(35)	100 ± 8,3	
0,01 mM	12,4 ± 2,4	(5)	102 ± 19,6	≫
0,1 mM	11,4 ± 0,62	(3)	100 ± 5,1	≫
1,0 mM	8,8 ± 1,39	(10)	73 ± 11,0	< 0,001
10,0 mM	6,02 ± 1,08	(15)	50 ± 8,9	< 0,001
100,0 mM	5,2 ± 0,89	(8)	43 ± 7,3	≫

2.2.3. Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} von Nierenschnitten erwachsener Ratten.

Tab. 8 zeigt die Wirkung von steigenden Konzentrationen NFA auf Nierengewebe erwachsener Ratten. Schon bei einer Konzentration von 0,01 mM NFA wird der Q_{O_2} gegenüber den Kontrollwerten signifikant erniedrigt, und zwar auf ca. 75%. Zwischen 0,01 und 100 mM verläuft die Dosis - Wirkungs - Kurve der Atmungshemmung bei erwachsenem Nierengewebe bei halblogarithmischer Darstellung nahezu linear wie sich aus Abb.3 erkennen läßt.

TABELLE 8 :

Natriumfluoracetat bei Nierengewebe in vitro.

P = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Dosis	Q_{O_2}	(Zahl)	%	P
Normalwert	20,7 ± 1,7	(23)	100 ± 8,2	
0,01 mM	15,3 ± 1,2	(6)	76 ± 5,8	>0,005
0,1 mM	13,2 ± 2,7	(7)	66 ± 13	≫
1,0 mM	10,3 ± 2,3	(6)	52 ± 11	>0,001
10,0 mM	7,92 ± 2,07	(7)	36 ± 10	>0,02
100,0 mM	5,39 ± 1,47	(14)	27 ± 7	≫

2.2.4 Vergleich der Wirkung von NFA auf Embryonen an Tag 11 und Tag 12 und auf Nierengewebe erwachsener Ratten.

Abb.3 zeigt, daß die Atmung von erwachsenen Nierengewebe durch NFA in Konzentrationen von 0,01 – 100 mM stärker gehemmt wird als die Atmung von Rattenembryonen an Tag 11 bzw. Tag 12. Aus Tab.9 geht hervor, daß es sich hierbei um signifikante Unterschiede der Atmungshemmung handelt, mit Ausnahme der Konzentration von 1,0 mM NFA bei Embryonen an Tag 11. Außerdem verlaufen die Hemmkurven der Embryonen an Tag 11 und Tag 12 in dem von uns untersuchten Bereich S – förmig. Besonders fällt dabei auf, daß bei einer Steigerung der Konzentration an NFA von 10 mM auf 100 mM eine Verstärkung der Atmungshemmung nicht mehr zu erzielen ist. Also sind ca. 40 % der Atmung der Embryonen an Tag 11 und Tag 12 auch durch hohe NFA Konzentrationen nicht hemmbar. Demgegenüber ist jedoch die Atmung von Nierengewebe erwachsener Ratten in demselben Bereich dosisabhängig bis auf 25% hemmbar.

TABELLE 9 :

Signifikanz der Differenzen der NFA – Wirkung in vitro.

Konzentration	Tag 11 und Tag 12	Niere und Tag 11	Niere und Tag 12
0,01 mM	$P \gg$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
0,1 mM	$P \gg$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
1,0 mM	$P < 0,01$	$P \gg$	$P < 0,001$
10 mM	$P \gg$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
100 mM	$P \gg$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

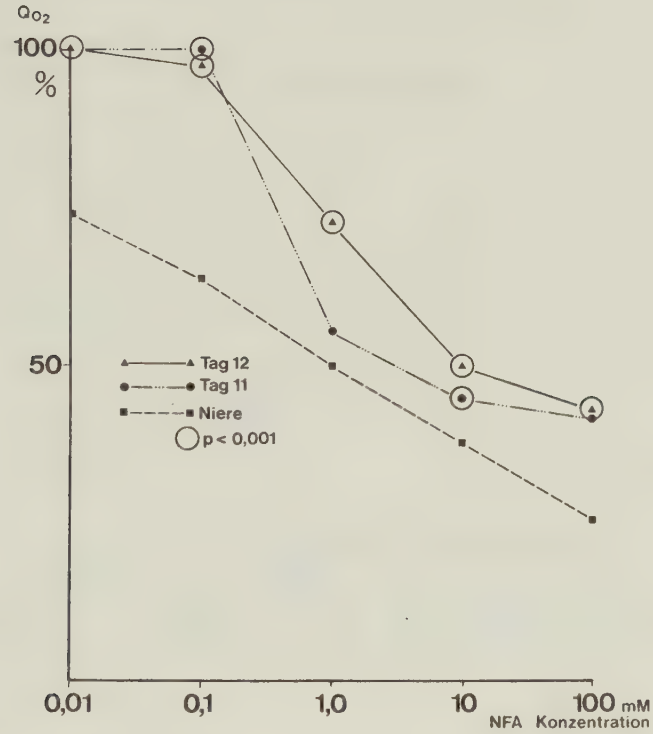

Abbildung 3:

Wirkung von Natriumfluoracetat in-vitro auf den Q_{O_2} von ganzen Embryonen und Nierenschnitten:

Die Originalmeßwerte ± Standardabweichung sind in Tabelle 6-8 aufgeführt. 100% Q_{O_2}-Werte entsprechen den in Tabelle I angegebenen Normalwerten. Die NFA-Konzentrationen sind logarithmisch aufgetragen. Die durch die Kreise angedeuteten signifikanten Unterschiede verschiedener Meßwerte sind genau in Tabelle 9 beschrieben.

3. Einfluß von 2 - DG und NFA in vivo auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht von Rattenembryonen Tag 11 und 12 sowie auf den Q_{O_2} von Nierenschnitten erwachsener Ratten.

3.1. Bestimmung der LD_{50} weiblicher Ratten nach Einzeldosen von 2 - DG und NFA.

3.1.1. LD_{50} nach Einzelgaben von 2 - DG.

Ca. 200g schweren weiblichen Ratten wurden Einzeldosen von 1 - 6 g/kg 2 - DG s.c. appliziert. Die Überlebensrate der Tiere wurde nach 3 Tagen festgestellt. Die Letalität ist in Tab.10 aufgeführt und in Abb.4 graphisch dargestellt. Die Dosis - Wirkungs - Beziehung ist S - förmig. Anhand dieser Kurve stellten wir die LD_{50} fest. Sie beträgt für 2 - DG bei einmaliger Applikation an ca. 200g schweren Ratten 3,2 g/kg. Auf grund dieser LD_{50} wurden bei den kurzfristigen in - vivo - Versuchen 0,5 , 1,0 bzw. 2,0 g/kg als Einzeldosis gewählt und bei längerfristigen nur 1 g/kg.

TABELLE 10 :

LD_{50} - Bestimmung von 2 - Desoxyglucose.

Dosis g/kg	Zahl der Tiere	Tote Tiere	Überlebende Tiere	Letalität in %
1,0	30	0	30	0
2,0	6	1	5	16
3,0	6	3	3	50
4,0	6	4	2	67
6,0	6	6	0	100

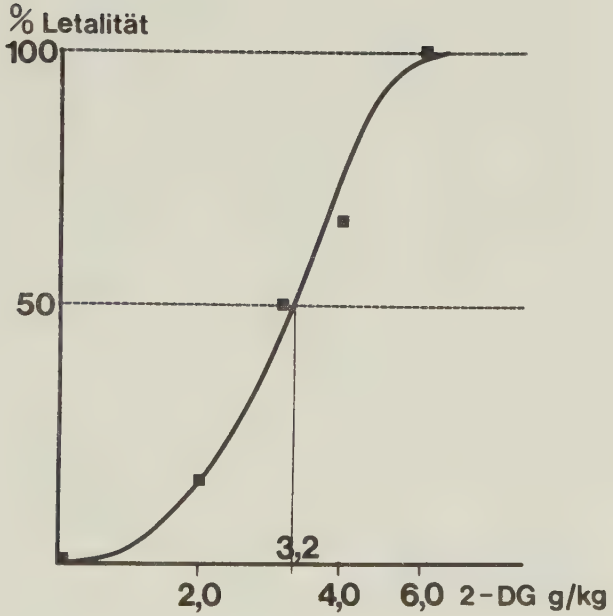

Abbildung 4:

Bestimmung der LD_{50} nach Einzelgaben von 2-Desoxyglucose bei erwachsenen weiblichen Ratten:

s.c. Applikation von 2-DG; die genauen Werte sind in Tabelle 10 aufgeführt. LD_{50} beträgt 3,2 g/kg 2-DG.

3.1.2. LD_{50} nach Einzeldosis von NFA.

In gleicher Weise wurden ca. 200g schwere weibliche Ratten mit i.p. Einzeldosen von 1,0 - 5,0 g/kg NFA behandelt und in den folgenden 3 Tagen die Überlebensrate festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tab.11 zusammengestellt und in Abb.5 graphisch veranschaulicht. Auch hier verläuft die Dosis - Wirkungs - Kurve wie erwartet S - förmig. Aus der Abb.5 läßt sich nach einmaliger i.p. Applikation von NFA eine LD_{50} von 2,2 mg/kg für 200g schwere weibliche Ratten ablesen. In den in - vivo - Experimenten mit NFA wurden deshalb in den Kurzzeitversuchen die Dosen von 1 - 4 mg/kg NFA als Einzeldosen gewählt und bei den langfristigen Versuchen eine Einzeldosis von nur 1 mg/kg NFA.

TABELLE 11 :

LD_{50} - Bestimmung von Fluoracetat.

Dosis mg/kg	Zahl der Tiere	Tote Tiere	Überlebende Tiere	Letalität in %
1,0	15	0	15	0
1,5	15	2	6	25
2,0	8	4	4	50
2,5	8	4	4	50
3,0	8	5	3	62
4,0	8	8	0	100
5,0	8	8	0	100

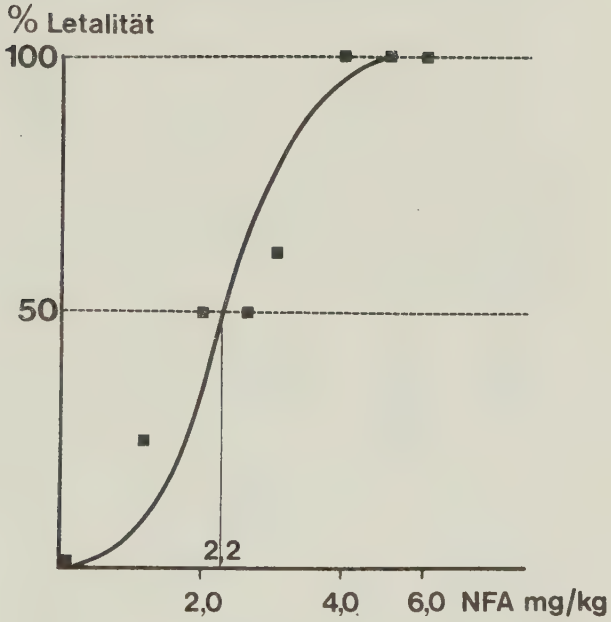

Abbildung 5:

Bestimmung der LD_{50} nach Einzelgaben von Natriumfluoracetat bei erwachsenen weiblichen Ratten:

i.p. Applikation von NFA; die genauen Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die LD_{50} beträgt 2,2 mg/kg NFA.

3.2. Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht in vivo.

3.2.1. Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} von 11- und 12 - Tage Embryonen und mütterlichem Nierengewebe 1 - 6 Stunden nach Behandlung der Muttertiere.

Weiblichen Ratten wurde an den Tagen 11 und 12 der Schwangerschaft eine einmalige Dosis von 0,5 , 1,0 bzw. 2,0 g/kg 2 - DG s.c. appliziert. 1 - 6 Stunden nach der Applikation wurde der Q_{O_2} der Embryonen sowie des mütterlichen Nierengewebes gemessen. Die erhaltenen Meßwerte sind in Tab.12 aufgeführt und die Q_{O_2} - Werte der 11 - und 12 - Tage Embryonen in Abb.6 graphisch dargestellt. Wie aus Tab.12 zu ersehen waren die Q_{O_2} - Werte des mütterlichen Nierengewebes unter dieser Behandlung unbeeinflußt, also immer 100 %. Deshalb wurden sie in der Abb.6 nicht dargestellt. Bei den verwendeten Dosen ist die Atmung der Embryonen an Tag 11 nach 1 - 3 Stunden unbeeinflußt. Nach 6 Stunden ist der Q_{O_2} der 11 - Tage Embryonen bei 1 g/kg 2 - DG gering und bei bei 2 g/kg 2 - DG signifikant vermindert (Tab.12, Abb.6). Die Atmung der Embryonen an Tag 12 ist nach der gleichen Behandlung mit 2 - DG mit Ausnahme einer geringen Verminderung der 1 - Std. - Werte unverändert (Tab.12, Abb.6). Die Trockengewichte der Embryonen waren bei diesen Versuchen an beiden Tagen gegenüber Kontroll - Embryonen nicht verändert und sind deshalb tabellarisch nicht aufgeführt.

TABELLE 12 :

Wirkung von 2 - Desoxyglucose in vivo nach 12 h.

Zeit	Dosis γ/Kg	Q_{O_2} Embryonen am Tag 11	p	Q_{O_2} Embryonen am Tag 12	p	Q_{O_2} Niere (Mutter)	p
Normalwerte		11,7 ± 1,2 (41)		12,0 ± 1,0 (35)		20,7 ± 1,7 (23)	
1h	0,5	10,8 ± 1,36 (6)	< 0,05	9,77 ± 0,68 (3)	<0,01	23,2 ± 0,7 (4)	≫
"	1,0	12,1 ± 0,71 (2)	≫	9,55 ± 1,34 (2)	<0,01	20,0 ± 1,1 (3)	≫
"	2,0	10,8 ± 0 (1)		10,67 ± 0,15 (3)	<0,05	17,2 ± 0,4 (3)	≫
3h	0,5	12,3 ± 0,71 (3)		12,2 ± 1,01 (3)	≫	20,2 ± 0,5 (3)	≫
"	1,0	13,8 ± 0,64 (2)	≫	11,6 ± 0,95 (3)	≫	20,6 ± 1,1 (2)	≫
"	2,0	13,8 ± 2,3 (2)	≫	11,77 ± 0,21 (3)	≫	23,3 ± 0,1 (3)	≫
6h	0,5	12,2 ± 0,42 (2)	≫	13,3 ± 0,61 (3)	≫	22,8 ± 0,5 (2)	≫
"	1,0	9,4 ± 1,13 (2)	< 0,01	12,2 ± 1,10 (3)	≫	19,5 (3)	≫
"	2,0	6,6 ± 3,67 (2)	< 0,001	11,9 ± 0,82 (3)	≫	22,5 ± 0,4 (2)	≫

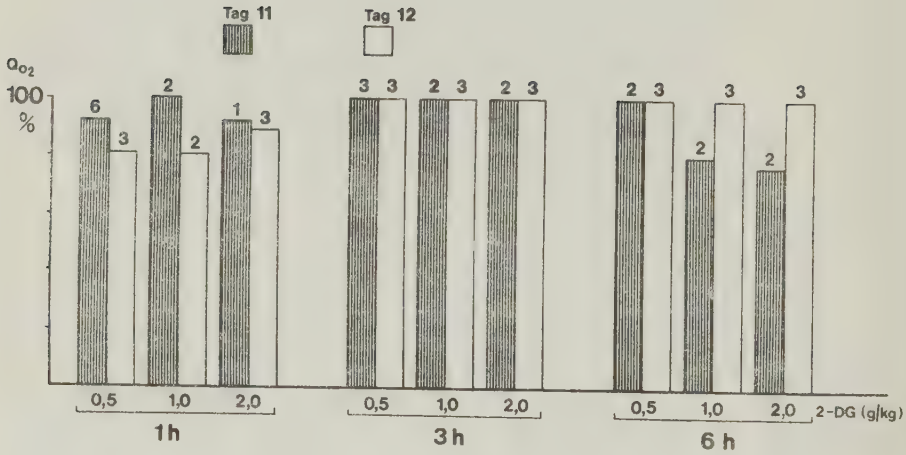

Abbildung 6:

Einfluß von Einzelgaben von 0,5–2 g/kg 2-Desoxyglucose auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen nach 1–6 Stunden:

Die Zahlen über den Säulen geben die Zahl der Messungen an und die Zeiten (1h, 3h, 6h) die Behandlungszeitpunkte, siehe auch Tabelle 12.

3.2.2 Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht von 11 - Tage Embryonen nach 2 - DG - Applikation vor mehr als 12 Stunden.

Weibliche Ratten wurden an den Tage 8,9 bzw. 10 der Schwangerschaft mit einer einmaligen Dosis von 1 g/Kg 2 - DG behandelt. Am Tag 11 der Gravidität wurden die Muttertiere getötet und der Q_{O_2} und das Trockengewicht der Embryonen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab.13 und in Abb.7 dargestellt. Aus diesen wird deutlich, daß eine einmalige Behandlung der Muttertiere mit 2 - DG an den Schwangerschaftstagen 8,9 bzw.10 zu einer signifikanten Erniedrigung des Q_{O_2} von Embryonen am Tag 11 führt. Gleichzeitig sind die so behandelten Embryonen am Tag 11 in der Entwicklung retardiert, wie sich an den deutlich erniedrigten Trockengewichten erkennen läßt. Bei der Präparation dieser Embryonen ließen sich unter dem Stereomikroskop keine Mißbildungen feststellen, gegenüber normalen 11 - Tage Embryonen schienen sie nur kleiner zu sein. Der Q_{O_2} des Nierengewebes der zugehörigen Muttertiere war in allen Experimenten unverändert. Deshalb wurden diese Q_{O_2} - Werte in Tab. 13 nicht aufgeführt.

TABELLE 13 :

Wirkung von 2 - Desoxyglucose auf Embryonen Tag 11 in vivo nach 12h.

Mit Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Zeit	Dosis g/Kg	Q_{O_2} (Zahl)	%	p	Gewicht (Zahl)	%	p
Normalwerte		11,7 ± 1,2 (41)	100		0,34 ± 0,08 (41)	100	
24h	1,0	8,87 ± 1,81 (14)	76 ± 15	< 0,001	0,25 ± 0,14 (14)	73	< 0,01
48h	1,0	9,02 ± 0,97 (11)	77 ± 8	< 0,005	0,28 ± 0,16 (11)	82	< 0,05
72h	1,0	7,91 ± 1,89 (13)	67 ± 16	< 0,001	0,23 ± 0,17 (13)	68	< 0,01

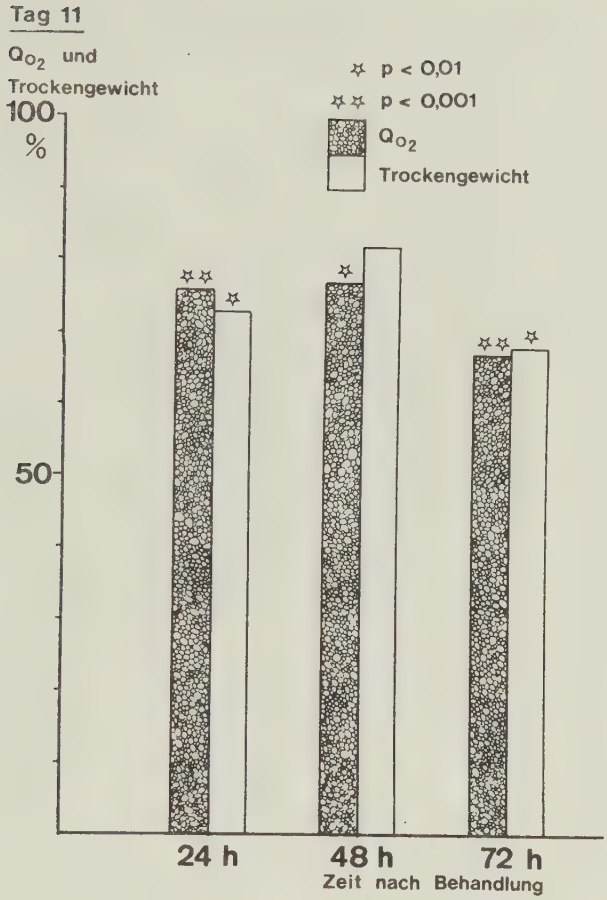

Abbildung 7:

Einfluß von Einzelgaben von 1 g/kg 2-Desoxyglucose an den Tagen 8-10 der Schwangerschaft auf Q_{O_2} und Trockengewicht von Rattenembryonen am Tag 11, also 24-72 Stunden später.

Die genauen Meßwerte ± Standardabweichung sind in Tabelle 13 aufgeführt.

3.2.3. Einfluß von 2 - DG auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht von 12 - Tage Embryonen nach 2 - DG - Applikation vor mehr als 12 Stunden.

Weibliche Ratten wurden an den Schwangerschaftstagen 8, 9, 10 bzw. 11 mit einer Einzeldosis von 1 g/kg 2 - DG behandelt. Am 12. Schwangerschaftstag wurden die Muttertiere getötet und der Q_{O_2} und das Trockengewicht der Embryonen bestimmt. Diese Meßwerte sind in Tab.14 und Abb.8 dargestellt. Es wird daraus deutlich, daß der Q_{O_2} der 12 - Tage Embryonen nach einer 2 - DG - Behandlung vor 24 bzw. 48 Stunden gering erniedrigt ist. Bei einer Behandlung vor mehr als 48 Stunden ist der Q_{O_2} gegenüber Kontrollwerten unverändert. Die Trockengewichte aller behandelten Embryonen sind jedoch vermindert. An diesen geringfügig retardierten Embryonen ließen sich jedoch mikroskopisch keine Mißbildungen erkennen. Die Q_{O_2} - Werte des mütterlichen Nierengewebes sind in Tab.14 nicht aufgeführt, da sie in allen Experimenten gegenüber Kontrollwerten unverändert waren.

TABELLE 14 :

Wirkung von 2 - Desoxyglucose auf Embryonen Tag 12 in vivo nach 12h.

P = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Zeit	Dosis g/Kg	Q_{O_2} (Zahl)	%	P	Gewicht (Zahl)	%	P
Normalwerte		12,0 ± 1,0 (35)	100		1,49 ± 0,31 (35)	100	
24h	1,0	10,8 ± 0,7 (4)	90 ± 5,8	< 0,02	1,15 ± 0,07 (4)	77	< 0,01
48h	1,0	10,35 ± 0,65 (15)	86 ± 5,4	< 0,003	1,13 ± 0,18 (15)	76	< 0,02
72h	1,0	10,9 ± 0,71 (14)	92 ± 5,9	≫	1,01 ± 0,11 (14)	68	< 0,001
96h	1,0	12,08 ± 1,09 (20)	100 ± 9,1	≫	1,21 ± 0,15 (20)	81	< 0,02

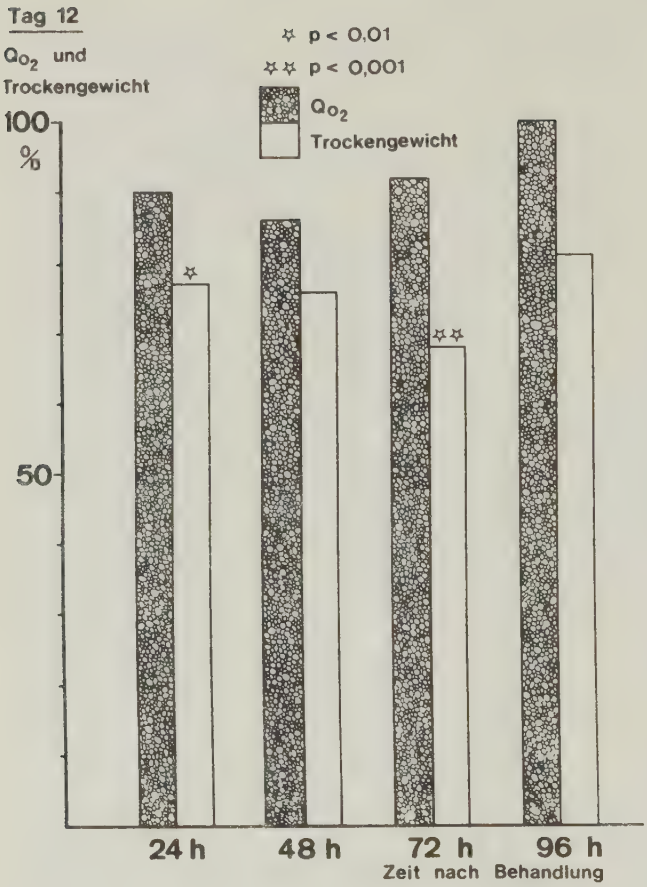

Abbildung 8:

Einfluß von Einzelgaben von 1 g/kg 2-Desoxyglucose an den Tagen 8 - 11 der Schwangerschaft auf Q_{O_2} und Trockengewicht von Rattenembryonen am Tag 12, also 24 - 96 Stunden später.

Die genauen Meßwerte sind in Tab.14 aufgeführt.

Vergleich der Wirkung von 2 - DG in vivo auf Embryonen an Tag 11 und 12 nach Behandlung vor mehr als 24 Stunden.

Behandelt man schwangere Ratten während der Organogenese an den Tagen 8,9 bzw. 10 mit Einzeldosen von 1 g/kg 2 - DG, so findet man den Q_{O_2} der Embryonen an Tag 11 deutlich erniedrigt. Bei der Untersuchung des Q_{O_2} am Tag 12 ist er nach Behandlung am Tag 8 oder 9 jedoch normal und nur nach Behandlung an den Tagen 10 oder 11 erniedrigt. Das Trockengewicht aller behandelten Rattenembryonen ist,wie die Untersuchung sowohl am Tag 11 als auch 12 zeigt,gering vermindert. Die behandelten Embryonen sind an diesen Tagen also leicht retardiert, jedoch nicht mißgebildet.

3.3. Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht in vivo.

3.3.1. Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} von 11 - und 12 - Tage alten Embryonen und von mütterlichen Nierengewebe 1 - 6 Stunden nach Behandlung der Muttertiere.

An den Schwangerschaftstagen 11 oder 12 wurden weibliche Ratten mit Einzeldosen von 1, 2, 3 bzw. 4 mg/kg NFA behandelt. 1 - 6 Stunden später wurde der Q_{O_2} der Embryonen und des mütterlichen Nierengewebes gemessen. Diese Ergebnisse sind in Tab.15 und Abb.9 dargestellt. Eine signifikante Erniedrigung der Q_{O_2}- Werte fand sich nur bei 4 mg/kg NFA am Tag 11 nach 6 Stunden. Einige andere Q_{O_2}- Werte waren am Tag 11 nach 1 und 6 Stunden gering erniedrigt. Bei den 12 Tage alten Embryonen war nach derselben Behandlung keine Hemmung der Atmung meßbar. Die Werte für mütterliches Nierengewebe waren sowohl bei den höheren NFA - Dosen nach 1 Stunde als auch bei allen NFA - Dosen nach 3 Stunden gering erniedrigt; sie wurden in Abb.9 nicht mit dargestellt. Die Trockengewichte der Embryonen waren 1 - 6 Stunden nach der Behandlung mit NFA an den Tagen 11 und 12 nicht verändert und sind daher nicht mitaufgeführt.

TABELLE 15 :

Wirkung von Natriumfluoracetat in vivo nach 12h.

p = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Zeit	Dosis g/Kg	Q_{O_2} Embryo am Tag 11	p	Q_{O_2} Embryo am Tag 12	p	Q_{O_2} Niere (Mutter)	p
Normalwerte		11,7 ± 1,2 (41)		12,0 ± 1,0 (35)		20,7 ± 1,7 (23)	
7h	[illegible]	9,35 ± 1,6 (4)	< 0,01	11,0 ± 0,93 (6)	≫	20,1 (3)	≫
"	[illegible]	10,2 ± 0,71 (2)	≫	13,1 ± 0,45 (2)	≫	20,4 ± 0,5 (2)	≫
"	[illegible]	9,7 ± 0,57 (2)	< 0,01	11,2 ± 0,1 (2)	≫	15,8 ± 2,0 (2)	< 0,05
"	4,0	6,5 ± 0 (1)		12,2 ± 0,5 (2)	≫	17,8 ± 3,2 (3)	< 0,05
3h	2,0	10,4 (1)	≫	11,3 ± 0,1 (2)	≫	17,8 ± 2,5 (2)	< 0,03
"	3,0	7,2 (1)	≫	12,1 ± 0,2 (2)	≫	16,8 ± 1,0 (2)	< 0,02
"	4,0	10,3 ± 0,9 (2)	≫	12,1 ± 0,45 (2)	≫	16,7 ± 2,8 (2)	< 0,03
[illegible]	[illegible]	10,5 ± 2,07 (4)	≫	11,4 ± 0,3 (3)	≫	19,7 ± [illegible],9 (2)	≫
[illegible]	2,0	9,7 ± [illegible],2 (7)	< 0,01	10,6 ± 1,3 (3)	> 0,05	18,9 ± 2,0 (5)	≫
"	4,0	6,6 ± [illegible],44 (3)	< 0,001	11,0 ± 0,6 (3)	≫	19,6 ± 2,9 (3)	≫

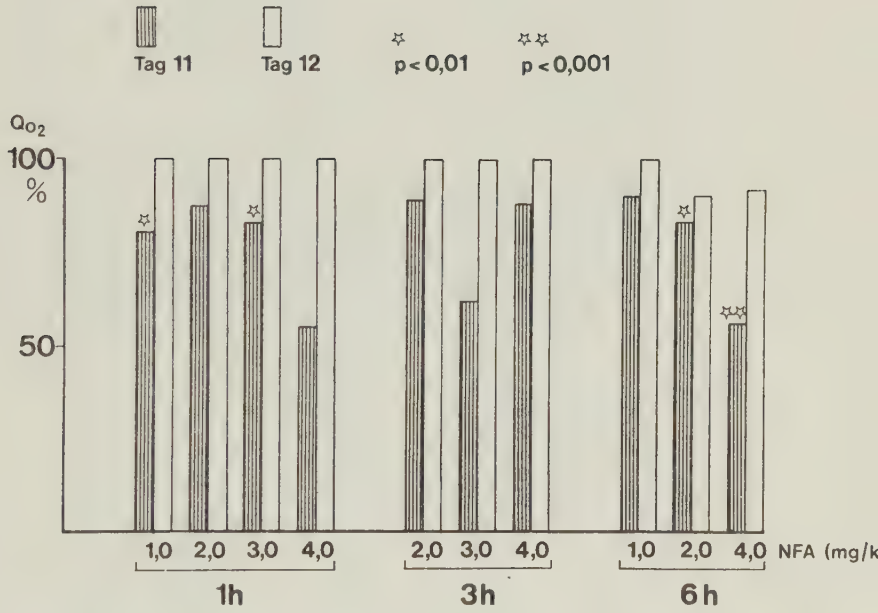

Abbildung 9:

Einfluß von Einzelgaben von 1 - 4 mg/kg Natriumfluoracetat an den Tagen 11 und 12 der Schwangerschaft auf den Q_{O_2} von Rattenembryonen nach 1 - 6 Stunden.

Die Zeiten unter den Säulen geben die Behandlungszeitpunkte an (1, 2 bzw. 6 h). Die genauen Meßwerte ± Standardabweichung sind in Tab.15 aufgeführt.

3.3.2 Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht von 11 - Tage alten Embryonen nach Behandlung vor mehr als 12 Stunden.

In diesen Experimenten wurde der Q_{O_2} und das Trockengewicht von 11 - Tage alten Embryonen gemessen, nachdem den Muttertieren 12, 24 bzw. 48 Stunden vor der Untersuchung eine einmalige Dosis von 0,5 bzw. 1,0 mg/Kg NFA i.p. injiziert wurde. Die Q_{O_2} - Werte und das Trockengewicht der Embryonen sind in Tab.16 und Abb.10a, 10b zusammengestellt. Sowohl nach Einzeldosen von 0,5 mg/Kg als auch von 1,0 mg/Kg NFA war die Atmung der Embryonen an Tag 11 signifikant erniedrigt. Auch die Trockengewichte der Embryonen waren signifikant vermindert nach dieser Behandlung. Mikroskopisch ließen sich wiederum keine äußerlich erkennbaren Mißbildungen an den gewichtsmäßig retardierten Embryonen nachweisen. Die Q_{O_2} - Werte des Nierengewebes der zugehörigen Muttertiere waren durch diese Behandlung unbeeinflußt und sind deshalb in Tab.16 nicht aufgeführt.

TABELLE 16 :

Wirkung von Natriumfluoracetat auf Embryonen Tag 11 in vivo nach 12h.

p = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

Zeit	Dosis mg/Kg	Q_{O_2} (Zahl)	%	p	Gewicht (Zahl)	%	p
Normalwerte		11,7 ± 1,2 (41)	100 ± 8		0,34 ± 0,08 (41)	100	
12h	0,5	9,36 ± 2,3 (5)	78 ± 19	< 0,001	0,237 ± 0,058 (5)	69	< 0,01
"	1,0	10,3 ± 0,56 (3)	85 ± 6	< 0,05	0,233 ± 0,05 (3)	68	< 0,01
24h	0,5	7,1 ± 2,22 (6)	59 ± 19	< 0,001	0,21 ± 0,015 (6)	62	< 0,001
"	1,0	7,59 ± 1,6 (14)	64 ± 13	< 0,001	0,23 ± 0,06 (14)	68	< 0,01
48h	0,5	8,04 ± 1,43 (5)	67 ± 12	< 0,001	0,24 ± 0,028 (5)	70	< 0,01
"	1,0	8,53 ± 1,59 (17)	71 ± 13	< 0,001	0,20 ± 0,05 (17)	59	< 0,001

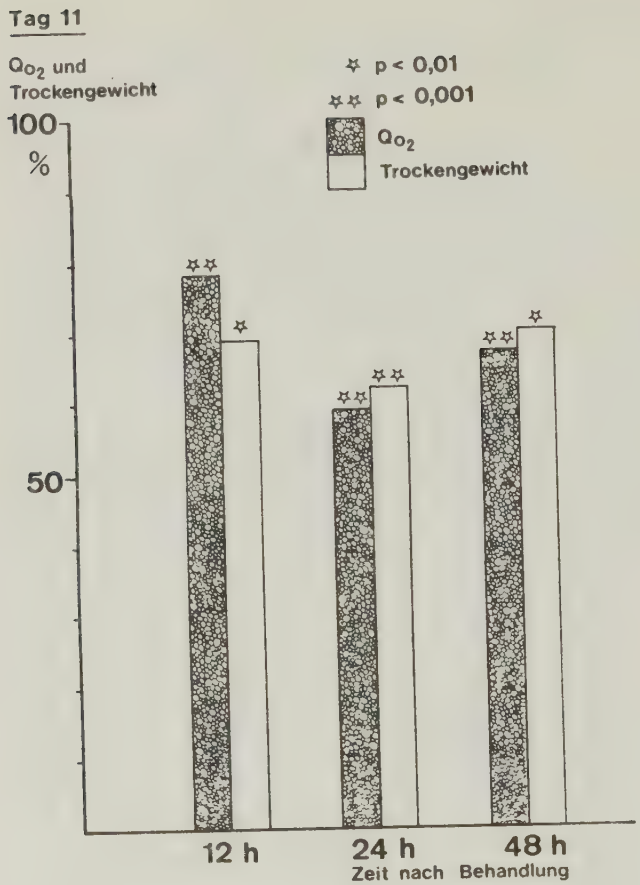

Abbildung 10a:

Einfluß von Einzelgaben von 0,5 mg/kg Natriumfluoracetat an den Tagen 9, 10 bzw. 10,5 der Schwangerschaft auf Q_{O_2} und Trockengewicht von Rattenembryonen am Tag 11, also 12 - 48 Stunden später.

Die genauen Meßwerte ± Standardabweichung sind in Tab.16 aufgeführt.

Abbildung 10 b:

Einfluß von Einzelgaben von 1,0 mg/kg Natriumfluoracetat an den Tagen 9, 10 bzw. 10,5 der Schwangerschaft auf Q_{O_2} und Trockengewicht von Rattenembryonen am Tag 11, also 12 - 48 Stunden später.

Die genauen Meßwerte ± Standardabweichung sind in Tab.16 aufgeführt.

3.3.3 Einfluß von NFA auf den Q_{O_2} und das Trockengewicht von 12 Tage alten Embryonen nach Behandlung vor mehr als 12 Stunden.

An den Schwangerschaftstagen 9, 10 bzw. 11 wurden weiblichen Ratten einmalige Dosen von 1 mg/Kg NFA appliziert. Am Tag 12 wurden der Q_{O_2} und das Trockengewicht der Embryonen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab.17 und Abb.11 dargestellt. Die Q_{O_2} - Werte und das Trockengewicht der 12 Tage alten Embryonen waren in allen Experimenten nicht signifikant vermindert. Nur 48 Stunden nach Applikation von 1 mg/Kg NFA fand sich eine leichte Hemmung der Atmung. Die Q_{O_2} - Werte von Nierengewebe der dazugehörigen Muttertiere waren ebenfalls gegenüber Kontrollwerten unverändert. Deshalb sind sie tabellarisch und graphisch nicht dargestellt.

TABELLE 12 :

Wirkung von Natriumfluoracetat auf Embryonen Tag 12 in vivo nach 12h.

≫ = Signifikanz gegenüber der nächst niedrigen Konzentration

	Dosis mg/Kg	O_2 (Zahl)	%	p	Gewicht (Zahl)	%	p
Normalwerte		12,0 ± 1,0 (35)	100 ± 8		1,49 ± 0,31 (35)	100	
24h	1,0	12,0 ± 1,05 (8)	100 ± 8,8	≫	1,49 ± 0,18 (8)	100	≫
48h	1,0	10,35 ± 1,34 (16)	86 ± 11	< 0,01	1,54 ± 0,21 (16)	100	≫
72h	1,0	12,16 ± 0,71 (14)	100	≫	1,39 ± 0,12 (14)	93	≫

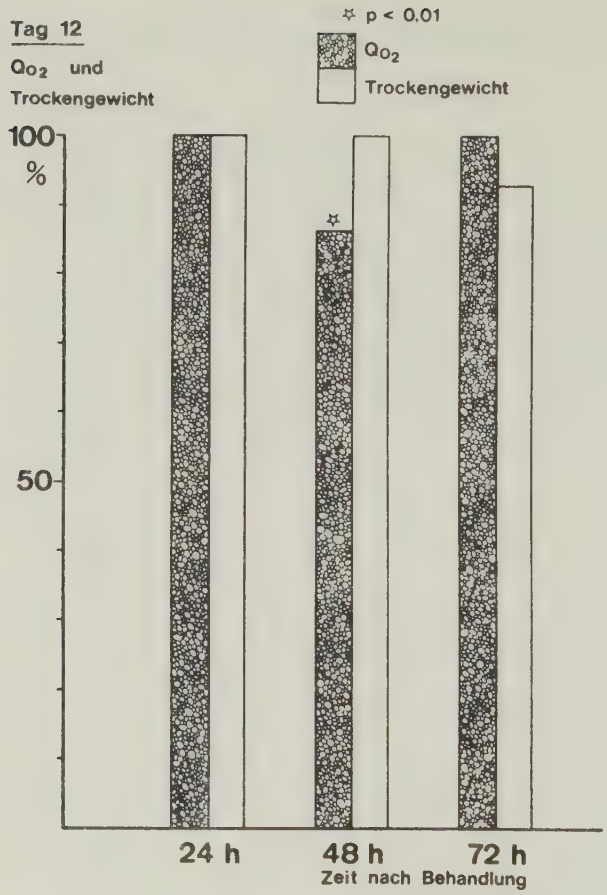

Abbildung II:

Einfluß von Einzelgaben von 1,0 mg/kg Natriumfluoracetat an den Tagen 9-11 der Schwangerschaft auf Q_{O_2} und Trockengewicht von Rattenembryonen am Tag 12, also 24-72 Stunden später.

Die genauen Meßwerte ± Standardabweichung sind in Tabelle 17 aufgeführt.

3.3.4 Vergleich der Wirkung von NFA auf Embryonen an Tag 11 und 12 nach Applikation vor mehr als 12 Stunden.

Die Behandlung schwangerer Ratten an den Tagen 8, 9, 10 der Gravidität mit Einzeldosen von 0,5 bzw. 1,0 mg/Kg NFA führt zu einer signifikanten Erniedirgung des Q_{O_2} der Embryonen an Tag 11. Dagegen ist die Atmung der 12 Tage alten Embryonen unbeeinflußt nach Behandlung mit 1 mg/Kg NFA. In gleicher Weise ist das Trockengewicht von 11 Tage alten Embryonen nach dieser Behandlung deutlich retardiert. Dagegen ist am Tag 12 kein Unterschied zu Kontrollwerten festzustellen. Der Q_{O_2} und das Trockengewicht haben sich also in den 24 Stunden zwischen Tag 11 und Tag 12 normalisiert.

4. Teratologie nach Gaben von 2 - DG bzw. NFA während der Organogenese.

Da Gaben von 2 - DG bzw. NFA während der Organogenese teilweise zu einer erheblichen Veränderung des Q_{O_2} und des Trockengewichtes der 11 bzw. 12 Tage alten Embryonen führten, untersuchten wir, ob auch die spätere Entwicklung der Embryonen durch diese Substanzen gestört wird. Wir behandelten deshalb schwangere Ratten an den Tagen 8, 9 bzw. 10 mit Einzeldosen von 2 - DG bzw. NFA und untersuchten die Embryonen am Ende der Schwangerschaft (Tag 20).

4.1 Teratologie nach Gabe von 2 - DG.

An den Tagen 8, 9 bzw. 10 der Schwangerschaft wurden den Ratten Einzeldosen von 1 g/Kg 2 - DG injiziert. Diese Tiere wurden am Tag 20 getötet. Die präparierten Embryonen wurden nach Entfernung sämtlicher Eihäute gewogen und auf äußerlich erkennbare Mißbildungen untersucht. Anschließend wurden sie nach dem Verfahren von Lorke ('63', '65') auf Skeletmißbildungen untersucht. In Tab.18 sind Gewichte der Embryonen, die Zahl der Embryonen pro Muttertier und die Mißbildungen der Embryonen verzeichnet. Da die Resorptionsrate in den von uns untersuchten Tieren gegenüber Kontrolltieren nicht erhöht war, wurde sie in der Tabelle nicht auf-

geführt. In Tab.18 zeigt sich, daß sich nach 2 - DG Gaben während der Organogenese das Feuchtgewicht der Embryonen nicht von dem unbehandelter Embryonen unterscheidet. Außerdem war die Zahl der Embryonen pro Muttertier in den behandelten und unbehandelten Gruppen gleich groß. Am Tag 20 konnten wir unter den mit 2 - DG behandelten Embryonen keine Mißbildung an Organen oder am Skelet feststellen.

TABELLE 18 :

Teratologie nach 2 - Desoxyglucose

Applikation	Dosis g/Kg s.c.	Zahl der Muttertiere	Zahl der Embryonen	Embryonen/M.Tier	F.-Gewicht/ Embryo	Mißbildungen
Normalwerte		34	256	7,5 ± 1,5	2,85 ± 0,334	keine
Tag 8	1,0	9	90	7,78 ± 1,39	3,05 ± 0,26	keine
Tag 9	1,0	7	65	9,29 ± 3,6	2,95 ± 0,17	keine
Tag 10	1,0	8	62	7,7 ± 2,1	2,94 ± 0,49	keine

4.2 Teratologie nach Gabe von NFA.

Schwangere Ratten wurden an den Tagen 9,10,11 bzw.12 mit einer Einzeldosis von 1 mg/Kg NFA behandelt. Die Embryonen wurden am Tag 20 nach den gleichen Kriterien wie bei den teratologischen Untersuchungen mit 2 - DG untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab.19 zusammengestellt. Die Resorptionsrate war gegenüber Kontrolltieren nicht verändert. Deshalb ist sie in der Tabelle 19 nicht aufgeführt. Die Zahl der Embryonen pro Muttertier war in den mit NFA behandelten Gruppen genauso groß wie bei den Kontrollgruppen wie aus Tab.19 hervorgeht. Die Tabelle zeigt außerdem, daß das Feuchtgewicht der behandelten Embryonen im Normbereich lag und keine Mißbildung an Organen oder am Skelet auftrat.

TABELLE 19 :

Teratologie nach Natriumfluoracetat.

Applikation	Dosis mg/Kg i.p.	Zahl der Muttertiere	Zahl der Embryonen	Embryonen/ Mutter Tier	F.-Gewicht/ Embryo	Mißbildungen
Normalwerte		34	256	7,5 ± 1,5	2,85 ± 0,334	keine
Tag 9	1,0	14	120	8,57 ± 2,1	3,12 ± 0,23	3% der Rippen schlecht verknöchert
Tag 10	1,0	7	46	6,6 ± 1,95	3,23 ± 0,19	keine
Tag 11	1,0	10	75	7,5 ± 2,1	3,21 ± 0,25	keine
Tag 12	1,0	12	107	8,7 ± 1,5	2,98 ± 0,16	keine

IV. DISKUSSION

1. Aussagekraft von Atmungsmessungen mit ganzen Embryonen.

Aus den in der Einleitung diskutierten Gründen kann man Atmungsmessungen mit ganzen Rattenembryonen mit der direkten Warburg - Methode nur an den Tagen 11 und 12 bei 37°C durchführen (Spielmann und Lücke '71'). Die von uns gefundenen Normalwerte dieser beiden Tage sind in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten anderer Untersucher aus demselben Labor (Spielmann und Lücke '71', '73'). Auch entsprechen diese von uns gefundenen Q_{O_2} - Werte von Rattenembryonen den von gleichwertig entwickelten Mäuseembryonen bei der Messung mit der direkten Warburg - Methode. Bartels und Baumann ('72') fanden bei Messungen in einer Atmungskammer mit einer Platin - Sauerstoff - Elektrode bei Mäuseembryonen von 0,2 mg Trockengewicht einen Q_{O_2} von 10,1 $\pm$ 3,2 bei Sauerstoffdrucken von 0,2 - 0,6 at. Pruzkova und Mitarbeiter ('72') untersuchten den Q_{O_2} menschlicher Embryonen des 1. Trimenon aus Abortmaterial. Sie fanden bei Messungen mit fetaler Leber, Gehirn, Niere und Herz Q_{O_2} - Werte zwischen 10 und 13. Diese neueren Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen befinden sich in weitgehender Übereinstimmung mit unseren Normalwerten, da bei diesen Experimenten die Grenzschnittdicke im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Negelein '25'; Netzloff '68a,b'; de Plaen '70') eingehalten wurde.

Da wir nur in der Lage sind den Q_{O_2} von Rattenembryonen an den Tagen 11 und 12 zu messen, sind unsere Aussagen über die Entwicklung des Energiestoffwechsels bei ganzen Rattenembryonen aus methodischen Gründen auf diese beiden Tage beschränkt. Nach bisherigen Ergebnissen anderer Untersucher mit verschiedenen Methoden ist die Glykolyserate bei Ratten-

embryonen am Tag 11 sehr viel höher als bei erwachsenem Gewebe (Tanimura und Shepard '70'; Neubert et al. '71b'; Cox und Gunberg '72a'). Daher ist zu erwarten, daß Hemmstoffe der Glykolyse bei 11 Tage alten Embryonen einen größeren Effekt haben als bei erwachsenem Gewebe. Wegen der niedrigen Aktivität der Enzyme der Atmungskettenphosphorylierung in embryonalem Gewebe (Akzu et al. '68'; de Vos et al. '68'; Bass '70'; Mackler et al. '73') ist andererseits zu erwarten, daß Hemmstoffe des Zitronensäure - Zyklus den Energiestoffwechsel von embryonalem Gewebe während der Organogenese und von erwachsenem Gewebe unterschiedlich beeinflussen.

2. Wirkung von 2 - DG und NFA auf die Atmung in vitro.

In vitro führten steigende Konzentrationen von 2 - DG zu einem linearen Abfall der Atmung sowohl bei embryonalem wie erwachsenem Gewebe. Bei 11 Tage alten Rattenembryonen war die Atmungshemmung bei gleichen 2 - DG Konzentrationen signifikant stärker als bei 12 Tage alten Embryonen und von erwachsenem Nierengewebe. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der Hypothese, daß die Glykolyse im Energiestoffwechsel der 11 Tage alten Embryonen eine größere Rolle spielt als bei 12 Tage alten Embryonen und erwachsenem Gewebe.

Der Verlauf der Atmungshemmung durch NFA in vitro bei embryonalem Gewebe unterscheidet sich deutlich von der Hemmung durch 2 - DG in vitro. Steigende Konzentrationen von NFA führten bei erwachsenem Nierengewebe zu einem linearen Abfall der Atmung, während die gleichen Dosen bei embryonalem Gewebe zu einem S - förmigen Verlauf der Atmungshemmungskurve führten und außerdem signifikant weniger wirksam waren. Die Dosis - Wirkungs - Kurve von NFA war zusätzlich dadurch charakterisiert, daß nach einer 50 - 60% -igen Hemmung der Atmung trotz

höheren Dosen von NFA kein weiterer Abfall der Atmung zu erreichen war. Unsere Ergebnisse zeigen also, daß erwachsenes Gewebe gegenüber NFA deutlich empfindlicher ist als embryonales Gewebe und daß im embryonalen Energiestoffwechsel der Teil, der durch NFA nicht hemmbar ist, größer ist als der von erwachsenem Gewebe. Es deutet darauf hin, daß ein größerer Anteil der oxidativen Phosphorylierung während dieser embryonalen Entwicklungsphase nicht vom Zitronensäure - Zyklus sondern wahrscheinlich von der Fettsäureoxidation abhängig ist (Neubert et al. '71a').

In - vitro - Untersuchungen des embryonalen Energiestoffwechsels mit Hilfe von 2 - DG und NFA wurden schon von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt (de Meyer und de Plaen '64'; Tanimura und Shepard '70b'). Es wurden von beiden Gruppen eine Verminderung biochemischer Parameter des embryonalen Energiestoffwechsels beschrieben; diese Experimente sind in ihrer Aussagekraft jedoch begrenzt, da die Untersucher nur jeweils zwei Hemmstoffkonzentrationen verwendeten und keine Dosis - Wirkungs - Kurve aufstellten.

Unsere Ergebnisse werden durch die Arbeit von Cox und Gunberg ('72b') unterstützt. Sie fanden bei ihren Untersuchungen des Energiestoffwechsels an isolierten Herzen von Rattenembryonen an den Tagen 11 bzw. 12, daß die Herzen von 12 Tage alten Embryonen gegenüber Malonat, einem Hemmstoff des Zitronensäurezyklus, signifikant empfindlicher waren als die Herzen von 11 Tage alten Embryonen. Cox und Gunberg ('72a,b') weisen darauf hin, daß gleichzeitig mit der Veränderung im Energiestoffwechsel der Rattenembryonen zwischen Tag 11 und 12 eine morphologisch - physiologische Veränderung der mütterlichen Versorgung der Embryonen stattfindet. Am Tag 12 ersetzt die sich von der Allantois ableitende Plazenta den viszeralen Dottersack als Organ des mütterlich - embryonalen Gas- und Nährstoffaustausches.

3. Embryonale Atmung nach Behandlung der Muttertiere mit 2 - DG und NFA.

Die Behandlung der Muttertiere mit 2 - DG während der frühen Organogenese führte zu einer deutlichen Verminderung des Trockengewichtes der Embryonen am Tag 11. Bei Behandlung der Muttertiere an den Tagen 8 bzw. 9 war dieser Effekt deutlicher als am Tag 10. Die Verminderung des Q_{O_2} der Embryonen auf 70 - 80% gegenüber Kontrollembryonen war nach Behandlung an den Tagen 8 bzw. 9 ebenfalls sehr deutlich. 11 Tage alte Embryonen, die in der Entwicklung und auch im Trockengewicht 20 - 30% zurückgeblieben sind, haben einen normalen Q_{O_2}. Daher sind die an Tag 8 bzw. 9 behandelten Embryonen, die am Tag 11 einen verminderten Q_{O_2} aufweisen, nicht nur retardiert sondern auch in ihrer Entwicklung geschädigt. Wenn man nach der gleichen Behandlung mit 2 - DG einen Tag später, also am Tag 12, Q_{O_2} und das Trockengewicht bestimmt, so sind diese Werte gegenüber Kontrollen kaum verändert. Die Embryonen müssen also in der Lage sein in den 24 Stunden zwischen Tag 11 und Tag 12 die durch 2 - DG in der frühen Organogenese - Phase verursachte Retardierung wieder auszugleichen.

Nach Behandlung mit NFA an Tag 9 bzw. 10 war der Q_{O_2} von Embryonen am Tag 11 in ähnlicher Weise vermindert. Bei Berücksichtigung des Trockengewichtes ging auch hier die Schädigung über eine einfache Retardierung hinaus. Im Gegensatz dazu waren bei Embryonen die einen Tag später, also am Tag 12 untersucht wurden, Q_{O_2} und Trockengewicht gegenüber Kontrollembryonen unverändert.

4. Teratologie.

Nach Behandlung schwangerer Ratten während der Organogenese mit 2 - DG bzw. NFA konnten wir am Ende der Schwangerschaft keinerlei Veränderung der grob morphologischen Struktur und der Skelett - Entwicklung der Embryonen feststellen. Diese Aussage stützt sich

sowohl auf die Wurfgröße, die Zahl der Resorptionen, das Feuchtgewicht der Embryonen als auch auf die Häufigkeit an Mißbildungen. Da wir an genauso behandelten Embryonen am Tag 11 der Gravidität Störungen der Entwicklung festgestellt hatten, die sich in veränderten Trockengewichten und Q_{O_2} - Werten ausdrückten, müssen wir annehmen, daß die Embryonen in der Lage waren, die kurzfristige frühe Entwicklungsstörung auszugleichen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen des Q_{O_2} und Trockengewichtes derselben Embryonen am Tag 12 deuten darauf hin, daß diese Entwicklungsstörungen schon gegen Ende der Organogenesephase korrigiert sind. Die Folgen der Störung des Energiestoffwechsels der Embryonen durch 2 - DG bzw. NFA sind demnach durch Mechanismen korrigiert worden, die schon zwischen Tag 11 und 12 aktiv sind. Unsere Ergebnisse beweisen also, daß die Embryonen schon während der Organogenese in der Lage sind, Entwicklungsstörungen, die auf eine Hemmung des Energiestoffwechsels zurückzuführen sind, zu korrigieren. Es läßt sich auf Grund unserer Untersuchungen jedoch nicht sagen, mit welchem Anteil der mütterliche bzw. embryonale Stoffwechsel an der "Entgiftung" der Hemmstoffe zu diesem Zeitpunkt beteiligt sind.

In ähnlicher Weise berichteten auch andere Autoren, daß Schäden, die während der Organogenese bei Ratten festgestellt wurden, bis zu einem gewissen Grade reversibel waren. Netzloff et al. ('68b') behandelten schwangere Ratten an den Tagen 10 - 12 mit dem Folsäureantagonisten 9 - Methylpteroylglutaminsäure; an Tag 13 stellten sie danach bei den Embryonen eine Verminderung des Trockengewichtes und der Atmung fest. 24 Stunden später, also am Tag 14, waren dieselben Parameter bei genauso vorbehandelten Embryonen wieder normal. Nach Behandlung schwangerer Ratten an den Tagen 9 bzw. 10 mit den oralen Antidiabetica Carbutamid, Tolbutamid bzw. Chlorpropramid fand de Plaen ('70') bei in - vitro - Versuchen am Tag 13 ein vermindertes Trockengewicht und eine geringere Produktion von $C^{14}O_2$ aus C^{14}-Laktat und

C^{14} - Acetat. Bei der Untersuchung genauso vorbehandelter Embryonen am Tag 14 bzw. 15 konnte er jedoch gegenüber unbehandelten Kontrollembryonen keinerlei Veränderungen der Entwicklung oder des Energiestoffwechsels mehr feststellen.

De Meyer und de Plaen berichteten 1964 über eine erhöhte Resorptionsrate sowie eine Vielzahl verschiedenartiger Mißbildungen der Embryonen nach Behandlung schwangerer Ratten mit 2 - DG bzw. NFA am Tag 9 bzw. 10 der Schwangerschaft. Dabei verwendeten sie ähnliche Dosen wie wir in unserer Arbeit. Es ist uns nicht möglich, eine Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate zu geben, eventuell ist das auf Stammes - Unterschiede zurückzuführen. Leider gibt es neben der kurzen Arbeit von de Meyer und de Plaen ('64') keine weitere Arbeit, die ähnliche teratogene Effekte von 2 - DG bzw. NFA bei Ratten beschreibt. Wegen des negativen Ergebnisses unserer teratologischen Untersuchungen am Ende der Schwangerschaft, war es uns nicht möglich, die Wirkung der beiden Substanzen auf den embryonalen Energiestoffwechsel genauer mit der embryotoxischen Wirkung in Beziehung zu setzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. In vitro nimmt die Atmung (Q_{O_2}) von Rattenembryonen am Tag 11 und 12 genau wie die von Nierengewebe erwachsener Ratten in Gegenwart von 2 - DG dosisabhängig linear ab, während die Atmung von erwachsenem Nierengewebe und von Embryonen am Tag 12 in fast identischem Ausmaß gehemmt wird, ist die Atmungshemmung durch 2 - DG bei Rattenembryonen am Tag 11 signifikant stärker.

2. In vitro nimmt die Atmung (Q_{O_2}) von Nierengewebe erwachsener Ratten in Gegenwart von NFA dosisabhängig linear ab. Dagegen verläuft die Dosis - Wirkungs - Kurve der Atmungshemmung durch NFA bei Embryonen am Tag 11 bzw. am Tag 12 S - förmig. Nach Erreichen einer 50 - 60% Atmungshemmung verringert sich bei den Embryonen die Hemmwirkung höherer Dosen. Im Vergleich zu erwachsenem Nierengewebe wird die Atmung von Rattenembryonen am Tag 11 bzw. am Tag 12 in vitro durch NFA signifikant geringer gehemmt.

3. 1 - 6 Stunden nach Applikation einer einmaligen Dosis 2 - DG (0,5 - 2 g/kg) an schwangere Ratten am Tag 11 bzw. am Tag 12 (LD_{50} = 3,2 g/kg) war die Atmung der Embryonen und auch die des mütterlichen Nierengewebes kaum verändert. Wahrscheinlich ist eine hochgradige Atemhemmung der Mutter (oder auch des Feten) nicht mit dem Leben vereinbar!

4. Nach Gabe einer einmaligen Dosis von 1 g/kg 2 - DG an schwangere Ratten an den Tagen 8, 9, 10 bzw. 11 war der Q_{O_2} und das Trockengewicht von Embryonen am Tag 11 reduziert. Bei Embryonen am Tag 12 waren die gleichen Parameter nur bei Applikation an den Tagen 10 oder 11 vermindert. Der Q_{O_2} des mütterlichen Nierengewebes war bei allen Experimenten unverändert.

5. 1 - 12 Stunden nach Eingabe einer Einzeldosis NFA (0,5 - 4 mg/kg) an schwangere Ratten (LD_{50} = 2,2 mg/kg) an den Tagen 11 bzw. 12

war die Atmung des mütterlichen Nierengewebes und der Embryonen am Tag 12 unverändert. Die Atmung der Embryonen am Tag 11 war nach 1 und 3 Stunden gering, jedoch nach 6 Stunden signifikant erniedrigt.

6. Nach Gabe einer Einzeldosis von 1 mg/kg NFA an schwangere Ratten an den Tagen 9 oder 10, war der Q_{O_2} und das Trockengewicht der Embryonen am Tag 11 signifikant vermindert. Die gleiche Behandlung schwangerer Ratten an den Tagen 9, 10 oder 11 veränderte weder den Q_{O_2} von Embryonen am Tag 12 noch den von mütterlichem Nierengewebe.

7. Nach Behandlung schwangerer Ratten an den Tagen 8, 9, 10 oder 11 mit einer einmaligen Dosis von 1 g/kg 2 - DG oder 1 mg/kg NFA konnten bei am Tag 20 getöteten Embryonen keine makroskopisch sichtbaren Mißbildungen, Gewichtsretardierungen oder Skeletveränderungen beobachtet werden.

8. Die in den Punkten 1 - 7 angeführten Ergebnisse unserer Untersuchungen werden im Zusammenhang mit der in der Literatur entwickelten Vorstellung über den Energiestoffwechsel der Rattenembryonen diskutiert. Dabei stimmen die Ergebnisse der Atmungshemmung durch 2 - DG bzw. NFA in vitro sehr gut mit der Hypothese überein, daß sich zwischen den Tagen 11 und 12 ein Wechsel im embryonalen Energiestoffwechsel von einem Überwiegen der Glykolyse zur vermehrten oxidativen Phosphorylierung vollzieht. Dies ist wahrscheinlich auf den Beginn der Versorgung der Embryonen über die Allantois - Plazenta zwischen den Tagen 11 und 12 der Schwangerschaft bei der Ratte zurückzuführen. Hemmstoffe der Zellatmung stellen offenbar keine Substanzklasse dar, von denen selektive Effekte auf das embryonale Gewebe und damit teratogene Effekte zu erwarten sind.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Akzu,O., Mackler,B., Shepard,T.H. und Lemire,R.J.: Studies of the development of congenital anomalies in embryos of riboflavin - deficient, galactoflavin fed rats. Teratology 1, 93 - 102, 1968.

Bartels,H. und Baumann,F.: Metabolic rate of early embryos (4 - 22 somites) at varying oxygen pressures. Resp. Physiol. 16, 1 - 15, 1972.

Bass,R.: Respiration and oxidative phosphorylation of mitochondrial fractions isolated from rat embryos, S.309 - 319. In: Metabolic Pathways in Mammalian Embryos during Organogenesis and its Modification by Drugs. Bass,R., Beck,F., Merker,H.-J., Neubert,D., und Randhahn,B., Eds. Freie Universität Berlin, 1970.

Brock,N., Druckrey,H. und Herken,H.: Untersuchungen über "Glykolyse". Biochem. Z. 300, 1 - 13, 1938.

Chaponik,K.P. und Waite,B.M.: Incorporation of a phospholipid precursor into the hemochorionic and yolk sac placentas associated with 9 - methylpteroylglutamic acid - treated rat embryos. Teratology 11, 247 - 256, 1975.

Cox,S.J. und Gunberg,D.L.: Metabolite utilization by isolated embryonic rat hearts in vitro. J. Embryol. exp. Morph. 28, 235 - 245, 1972a.

Cox,S.J. und Gunberg,D.L.: Energy metabolism in isolated rat embryo hearts: effect of metabolic inhibitors. J. Embryol. exp. Morph. 28, 591 - 599, 1972b.

Elliot,W.B. und Kalnitzky,G.: A mechanism for fluoroacetate inhibition. J. Biol. Chem. 186, 487 - 493, 1950.

Fuchs,G.: Mathematik für Mediziner und Biologen. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1969.

Johnson,E.M., Nelson,M.M. und Monie,I.W.: Effects of transitory pteroylglutamic acid (pga) deficiency on embryonic and placental development in the rat. Anat. Rec. 146, 215 - 224, 1963.

Kleiber,M., Cole,H.H. und Smith,A.H.: Metabolic rate of rat fetuses in

vitro. J. Cell. Comp. Physiol. 22, 167 - 176, 1943.

Köhler,E. und Peters,H.: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Glucose in embryonalem Säugetiergewebe. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 266, 371 - 372, 1970.

Köhler,E., Merker,H.-J., Ehmke,W. und Wojnorowicz,F.: Growth kinetics of mammalian embryos during the stage of differentiation. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 272, 169 - 181, 1972.

Lenz,W.: Thalidomide and congenital abnormalties. Lancet 45, 1962.

Lorke,D.: Zur Methodik der Untersuchungen embryotoxischer und teratogener Wirkungen an der Ratte. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 246, 147 - 151, 1963.

Lorke,D.: Embryotoxische Wirkungen an der Ratte. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 250, 360 - 382, 1965.

Mackler,B., Grace,R., Haynes,B., Bargman,G.J. und Shepard,T.H.: Studies of mitochondrial energy systems during embryogenesis in the rat. Arch. Biochem. Biophys. 158, 662 - 666, 1973.

De Meyer,R. und de Plaen,J.: An approach to the biochemical study of teratogenic substances on isolated rat embryo. Life Sciences 3, 709 - 713, 1964.

Negelein,E.: Über die glykolytische Wirkung des embryonalen Gewebes. Biochem. Z. 165, 122 - 133, 1925.

Netzloff,M.L., Chepenik,K.P., Johnson,E.M. und Kaplan,S.: Respiration of rat embryos in culture. Life Sciences 7, 401 - 405, 1968a.

Netzloff,M.L., Johnson,E.M. und Kaplan,S.: Respiratory changes observed in abnormally developing rat embryos. Teratology 1, 375 - 386, 1968b.

Netzloff,M.L., Johnson,E.M. und Kaplan,S.: Effects of a teratogen (9 - methyl pteroylglutamic acid) on oxygen consumption by dispersed embryonic rat cells. Teratology 5, 19 - 22, 1972.

Neubert,D., Merker,H.-J., Köhler,E.,Krowke,R. und Barrach,H.J.: Biochemical aspects of teratology, S.575 - 621. In: Advances in the Biosciences 6. Raspe,G. Ed. Pergamon Press - Vieweg Verlag, Oxford - Braunschweig, 1971.

Neubert,D., Peters,H., Teske,S., Köhler,E. und Barrach,H.J.: Studies on the problem of "aerobic glycolysis" occuring in mammalian embryos. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 268, 235 - 241, 1971.

De Plaen,J.: Aspects dynamiques du metabolisme glycidique chez l'embryon de rat. Action de substances hypoglycemiantes en teratogenes. Bruxelles: Editions Arscisa, Paris: Librairie Maloine, 1970.

Pruzkova,V., Jirasek,J., Mourek,J., Zwinger,A. und Capkova,A.: Oxygen consumption in some human fetal tissues. Biol.Neonate 20, 170 - 174, 1972.

Shepard,T.H., Lemire,R.J., Aksu,O. und Mackler,B.: Studies of the development of congenital anomalies in embryos of riboflavin - deficient, galactoflavin fed rats. Teratology 1, 75 - 92, 1968.

Spielmann,H. und Lücke,I.: Problems connected with the measurement of the respiratory rate of whole rat embryos in vitro. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 270, 10 - 17, 1971.

Spielmann,H. und Lücke,I.: Changes in the respiratory activity of different tissues of rat and mouse embryos during development. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 278, 151 - 164, 1973.

Tanimura,T. und Shepard,T.H.: Glucose metabolism by rat embryos in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 135, 51 - 54, 1970a.

Tanimura,T. und Shepard,T.H.: Utilization of glucose carbon by rat embryos in vitro and in vivo and effects of 2 - deoxy - D - glucose. Teratology 3, 210, 1970b.

De Vos,M.A., Wilmink,C.W. und Hommes,F.A.: Development of some mitochondrial oxidase systems of rat liver. Biol.Neonat. 13, 83 - 89, 1968.

Warburg,O.: Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. Biochem.Z. 142, 317 - 333, 1923.

Warburg,O., Posener,K. und Negelein,E.: Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. Biochem.Z. 152, 309 - 335, 1924.

Wick,A.N., Drury,D.R., Nakada,H.I. und Wolfe,J.B.: Location of the primary metabolic block produced by 2 - deoxyglucose. J. Biol. Chem. 224, 963 - 969, 1957.

An dieser Stelle möchten wir Herrn Professor Dr. Diether Neubert für die Überlassung des Themas und die Anregungen bei der Durchführung der Arbeit danken.

Die Arbeit wurde im Wesentlichen im Bereich der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Horst Spielmann durchgeführt. Er war uns bei allen auftretenden Problemen in großzügiger Weise behilflich.

Zu Dank verpflichtet sind wir weiterhin Fräulein Ingrid Lücke für ihre Unterstützung als technische Assistentin bei den Experimenten, Frau Imke Dillmann für die histologische Aufarbeitung der anatomischen Präparate, Frau Margret Rautenberg für die photographischen Arbeiten, sowie Frau Birgit Winkler für das Schreiben der Arbeit.

VII. Lebensläufe

1. Rainer Meyer-Wendecker

Am 27. November 1946 wurde ich als dritter Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Rudolf Meyer-Wendecker und seiner Ehefrau Ursula, geb. Krause-Heiber, in Bremen geboren. Dort Einschulung 1953 und Abitur am altsprachlichen Gymnasium 1966. Studium der Veterinärmedizin SS 1967 an der Justus-von-Liebig-Universität in Gießen und WS 1967/68 an der Freien Universität Berlin. Studium der Medizin ab SS 1968 bis zum Staatsexamen im Februar 1974 ebenfalls in Berlin. Als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut und in der Inneren Abteilung am Klinikum Westend der Freien Universität Berlin vom April bis September 1974. Im Studienjahr 1974/75 Stipendium an der Stanford University/California, USA, (mit Praktika in allgemeiner Psychatrie und Kinderpsychatrie sowie Studium der Psychologie, medizinischen Anthropologie und Genetik). 1975 als Medizinalassistent in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Weilheim/Obb. und in der allgemeinen Landpraxis bei Dr. Paul Lüth in Knüllwald-Rengshausen. Im Dezember 1975 Approbation. Seit März 1976 Assistenzarzt an der II. Inneren Abteilung des Auguste-Viktoria-Krankenhauses in Berlin.

2. Frauke, Meta, Hanna Spielmann

Am 3. September 1947 wurde ich als ältestes von zwei Kindern des praktischen Arztes Dr. med. Siegfried Wehmann und seiner Ehefrau Erika, geb. Wappler, wohnhaft in Kirchhatten bei Oldenburg, geboren. Nach Besuch der Grundschule in Kirchhatten wechselte ich 1958 zum Mädchengymnasium Caecilienschule Oldenburg. Nach der Reifeprüfung 1966 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. 1971 heiratete ich den wissenschaftlichen Assistenten Dr. med. Horst Spielmann. In den Jahren 1972/73 verbrachte ich 12

Monate in den USA und war Gaststudent an den Medical Schools der University of Washington in Seattle und der University of California in San Francisco, während mein Mann dort als wissenschaftlicher Assistent arbeitete. Nach der Rückkehr legte ich 1974 das Medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin ab. Nach abgeschlossener Medizinalassistentenzeit bin ich seit Anfang 1976 Assistenzärztin in der 3. Medizinischen Klinik im Auguste-Viktoria-Krankenhaus Berlin Schöneberg.